

Biochemische Untersuchungen zur  
Glutamyl-tRNA-Reduktase im C<sub>5</sub>-Weg  
und die Klonierung einer Teilsequenz des korrespondierenden hemA-Gens der einzelligen Grünalge  
*Scenedesmus obliquus*

# Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

dem Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von Steffen Borzner aus Frankfurt am Main

Marburg / Lahn 1997

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 02.09.1997 angenommen.

Erstgutachter : Herr Prof. Dr. H. Senger

Zweitgutachter : Herr Prof. Dr. D. Werner

Tag der mündlichen Prüfung am 17.09.1997

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
  - 1.1 Die Tetrapyrrole und ihre Biosynthese
  - 1.2 Die Bildung von 5-Aminolävulinsäure
  - 1.3 Die Enzyme des C<sub>5</sub>-Weges
    - 1.3.1 Die Glutamyl-tRNA-Synthetase und die tRNA<sup>Glu</sup>
    - 1.3.2 Die Glutamyl-tRNA-Reduktase
    - 1.3.3 Die Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSA-AM)
2. Problemstellung
3. Material und Methoden
  - 3.1 Organismen und Anzucht
    - 3.1.1 Die einzellige Grünalge *Scenedesmus obliquus*
    - 3.1.2 Dunkelanzucht von Gerste (*Hordeum vulgare* L.)
    - 3.1.3 Anzucht von *E. coli*
    - 3.1.4 Anzucht von Bakteriophagen
    - 3.1.5 Entsorgung von Mikroorganismen
  - 3.2 Bestimmung von Bezugsgrößen
    - 3.2.1 PCV-Bestimmung
    - 3.2.2 Proteinbestimmung
    - 3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wäßrigen Lösungen
  - 3.3 Bestimmung einiger Enzymaktivitäten des C<sub>5</sub>-Weges
    - 3.3.1 Die Messung der Glutamyl-tRNA-Synthetase-Aktivität
    - 3.3.2 Versuche zur Beladung von tRNA mit radioaktivem 2-Oxoglutarat
    - 3.3.3 Die Messung der Glutamyl-tRNA-Reduktase-Aktivität
  - 3.4 Anreicherung und Reinigung von Enzymen des C<sub>5</sub>-Weges
    - 3.4.1 Herstellung eines zellfreien Rohhomogenates

- 3.4.2 Anreicherung von Komponenten des  $C_5$ -Weges durch ein serielles Säulenchromatographiesystem
  - 3.4.2.1 Gelfiltration über TSKgel Toyopearl HW-55 F
  - 3.4.2.2 Affinitätschromatographie an Blue Sepharose
  - 3.4.2.3 Affinitätschromatographie an Matrex Gel Red A
  - 3.4.2.4 Affinitätschromatographie an Chlorophyllin-Sepharose
  - 3.4.2.5 Isolierung der tRNA aus dem Chlorophyllin-Sepharose-Eluat
- 3.4.3 Entsalzen, Umpuffern und Konzentrierung von Proteinlösungen
- 3.5 Isolierung und Auftrennung von Nukleinsäuren
  - 3.5.1 Isolierung von hochmolekularer genomischer DNA
  - 3.5.2 Isolierung von Plastiden DNA aus *Scenedesmus obliquus*
  - 3.5.3 Isolierung von Gesamt-RNA
  - 3.5.4 Anreicherung von Poly(A)-mRNA
  - 3.5.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*
  - 3.5.6 Ethanolfällung
  - 3.5.7 Phenolextraktion
  - 3.5.8 Restriktionsverdau
- 3.6 Gelelektrophorese und Elution der aufgetrennten Nukleinsäuren
  - 3.6.1 Elektrophorese von DNA über Agarosegele unter nicht-denaturierenden Bedingungen
  - 3.6.2 Elektrophorese von RNA unter denaturierenden Bedingungen
  - 3.6.3 Elution der Restriktions-Fragmente mit Hilfe der "Prep-A-Gene"-Methode
  - 3.6.4 Elution der Restriktions-Fragmente mit Hilfe des Amicon Zentrifugationssystems
- 3.7 Blotting Methoden
  - 3.7.1 Southern Blot
  - 3.7.2 Northern Blot
  - 3.7.3 Hybridisierung mit nicht-radioaktiv markierten Sonden
  - 3.7.4 Screening von cDNA-Bibliotheken durch Phagenhybridisierung
  - 3.7.5 Chemilumineszenz-Detektion
  - 3.7.6 Colorimetrische-Detektion
- 3.8 Komplementations-Versuche

- 3.8.1 Verwendete DNA-Bibliotheken
- 3.8.2 In-vivo
  - Exision der cDNA-Bibliotheken
- 3.8.3 Herstellung kompetenter Zellen
- 3.8.4 Transformation einer *hemA*-defizienten Mutante von *E. coli*
- 3.9 PCR-Techniken
  - 3.9.1 Synthese einzelsträngiger cDNA als Matrize für PCR-Reaktionen
  - 3.9.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
  - 3.9.3 Klonierung von PCR-Produkten
- 3.10 DNA-Sequenzierung
  - 3.10.1 Radioaktive Sequenzierungsreaktion mit Sequenase 2.0
  - 3.10.2 Auftrennung der sequenzierten DNA-Proben durch Gelelektrophorese
  - 3.10.3 Automatische DNA-Sequenzierung
  - 3.10.4 DNA- und Proteinsequenzauswertung

#### 4.

#### Ergebnisse und Diskussion

#### 4.1

#### Biochemische Untersuchungen zur Glutamyl-tRNA-Reduktase aus *Scenedesmus obliquus*

#### 4.1.1

#### Versuche zur Reinigung der Glutamyl-tRNA-Reduktase aus *Scenedesmus obliquus*

#### 4.2

#### Diskussion zu Kapitel 4.1

#### 4.3

## Strategien zur Klonierung der Glutamyl-tRNA-Reduktase

### 4.4

#### Komplementation von *hemA*-Gen defizienten Mutanten von *E.coli*

##### 4.4.1

##### Transformation durch Elektroporation

##### 4.4.2

##### Identifizierung der komplementierten Klone

### 4.5

#### Diskussion zu Kapitel 4.4

### 4.6

#### Polymerasekettenreaktion (PCR)

##### 4.6.1

##### Ableitung von Oligonukleotidprimern aus konservierten Sequenzen des *hemA*-Gens verschiedener Organismen

##### 4.6.2

##### Amplifikationsexperimente mit cDNA als Template-DNA

##### 4.6.3

##### Klonierung und Sequenzierung des entstandenen PCR-Produktes

##### 4.6.4

Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des PCR-Produktes B1 mit Aminosäuresequenzen anderer Glutaryl-tRNA-Reduktasen

#### 4.6.5

Vergleich der Aminosäuresequenz des PCR-Produktes B1 mit Sequenzen anderer Glutaryl-tRNA-Reduktasen, die durch das *hemA* 2-Gen kodiert werden.

#### 4.7

Diskussion zu Kapitel 4.6

#### 4.8

Southern-Blot -Experiment mit dem DIG-markierten 222 bp langen PCR-Produkt B1

#### 4.9

Diskussion zu Kapitel 4.8

#### 4.10

Screenen der cDNA-Bibliotheken von *Scenedesmus obliquus* mit der DIG-markierten Sonde B1

##### 4.10.1

Restriktionsverdau positiv reagierender Klone

##### 4.10.2

Southern-Blot-Analyse der Klone 18b und 20b mit der Sonde B1

##### 4.10.3

Identifizierung und partielle Charakterisierung des cDNA-Klones 18b durch Sequenzanalyse

#### 4.10.4

Identifizierung und Charakterisierung cDNA-Klones 20b durch Sequenzanalyse

#### 4.10.5

Charakterisierung der 1511 bp langen Insert-Sequenz des Klones 20b

#### 4.11

Diskussion zu Kapitel 4.10

#### 5.

Zusammenfassung

#### 6.

Literaturverzeichnis

## Abkürzungen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden :

<b>ADP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>ALA</b>	Aminolävulinsäure
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>ARS</b>	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ATP</b>	Adenosin-5`-triphosphat
<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-Chloro-2-2-Indolyl-Phosphat
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>DAVA</b>	4,5-Diaminovalerat
<b>DIG</b>	Digoxigenin
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DOVA</b>	4,5-Dioxovalerat
<b>GluRS</b>	Glutamyl-tRNA-Synthetase
<b>GluTR</b>	Glutamyl-tRNA-Reduktase
<b>GSA</b>	Glutamat-1-Semialdehyd
<b>GSA-AM</b>	Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase
<b>hem</b>	Nukleinsäuresequenz
<b>A</b>	
<b>HemA</b>	Aminosäuresequenz
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>LB</b>	Nährmedium nach Luria Bertani
<b>NADPH</b>	Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
<b>NBT</b>	4-Nitro Blue Tetrazolium Chlorid
<b>PCA</b>	Perchloressigsäure
<b>PLP</b>	Pyridoxalphosphat
<b>PMP</b>	Pyrodoxaminphosphat
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>SDS</b>	Natrium-Dodecylsulfat
<b>SM</b>	Phagenextraktionsmedium
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure



TEACL	Tetraethylammoniumchlorid
TEMED	N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin
Tresyl-Chlorid	2,2,2-Trifluormethansulfonylchlorid
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Senger danke ich herzlich für seine Themenstellung, die großzügige Unterstützung und seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dörnemann für seine Hilfestellung, die intensive Förderung und Unterstützung dieser Arbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn PD Dr. Schulz bedanke ich mich sehr für sein reges Interesse und seine Hilfestellung und Beratung bei molekularbiologischen Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn (Institut für Organische Chemie und Biochemie Universität Freiburg) danke ich für das Einbringen seiner reichhaltigen Erfahrungen bei der Reinigung der GluTR aus *E. coli*, und die damit verbundene Unterstützung in dieser Arbeit. Ferner danke ich ihm für die Bereitstellung der *E.coli*-Mutanten EV 61 und GE 1387, sowie seine stetige Diskussionsbereitschaft zu molekularbiologischen Fragen dieser Arbeit.

Herrn Dr. C.G. Kannangara (Carlsberg Laboratorium in Kopenhagen) danke ich für die Einarbeitung in die Methode zur Aktivitätsmessung an dem Enzym Glutamyl-tRNA-Reduktase aus *Hordeum vulgare*.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Stolz für die anfängliche Einführung in viele Arbeitsmethoden und Frau Dr. Venhaus für ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Unseren technischen Assistentinnen Brigitte Zinn, Jutta Gade, und Yvonne Deiss sowie den Auszubildenden Ulrike Lehnard und Diana Baranczyk danke ich für die Bereitstellung von Stammkulturen, Kulturmedien, autoklavierten Lösungen und die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Senger möchte ich mich herzlich für die freundliche Atmosphäre und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Diese Arbeit ist Teil eines DFG-Projektes von PD Dr. Dörnemann und wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Frau Nina. Ohne ihre Geduld und kritische Reflexion meiner Tätigkeit, sowie die Übernahme des größten Teils der Arbeit mit unseren drei Kindern wäre es sicher nicht möglich gewesen, diese Dissertation anzufertigen.

Meinen Eltern danke ich für ihre wirtschaftliche Unterstützung während dieser Arbeit.

Steffen Borzner, Marburg den 01.09.1997

## 1 Einleitung

### 1.1 Die Tetrapyrrole und ihre Biosynthese

Die Stoffklasse der Tetrapyrrole wird von allen lebenden Organismen gebildet und ist für deren Existenz essentiell (Battersby, 1985; Avissar und Moberg, 1995). Das Grundgerüst der Tetrapyrrole besteht aus vier Pyrrolringen, die entweder zu einem linearen Molekül oder zu einem Makrozyklus miteinander verknüpft sind (Abb. 1). Das Grundgerüst der meisten zyklischen Tetrapyrrole leitet sich vom Porphyrin ab. Die Stoffklasse der Porphyrine besitzt ein ausgedehntes, konjugiertes

$\pi$ -Elektronensystem mit aromatischem Charakter (Bonnett, 1979), das in der Lage ist, sichtbares Licht aus dem Sonnenspektrum selektiv zu absorbieren. Die Farbigkeit vieler Tetrapyrrolsysteme, wie z.B. die der Chlorophylle und Häme, und ihre Funktion, wie z.B. die des Phytochromsystems als Photorezeptor, ist auf diese Fähigkeit des  $\pi$ -Elektronensystems zur Lichtabsorption zurückzuführen (Furuya, 1989; 1993). Die Vielzahl der in der Natur existierenden, zyklischen Tetrapyrrole unterscheidet sich durch die Art der von ihnen komplexierten Metallatome, bzw. durch das Substitutionsmuster ihrer Seitenketten. Je nach Zentralatom und Substitutionsmuster spielen sie eine unterschiedliche Rolle bei verschiedenen Prozessen in der Zelle.

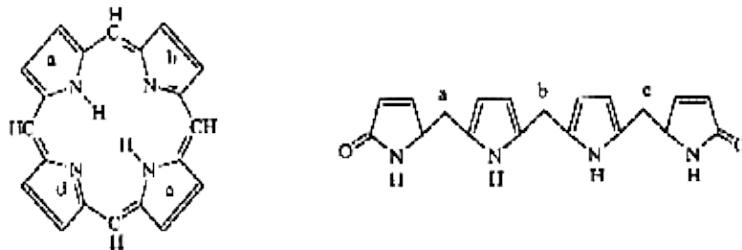


Abb. 1:

Grundgerüst zyklischer und offenkettiger Tetrapyrrole. a: Porphyrin, b: Bilan

Die Biosynthese der Tetrapyrrole verläuft in Teilen der Synthesesequenz über identische Zwischenstufen. Das erste, gemeinsame Intermediat ist die 5-Aminolävulinsäure (ALA). Für die Bildung von ALA existieren in der Natur zwei unterschiedliche Möglichkeiten: Der Shemin-Weg und der C<sub>5</sub>-Weg, worauf in Kapitel 1.1 noch näher eingegangen werden wird. Der Syntheseweg von ALA bis zum ersten, makrozyklischen Tetrapyrrol, dem Uroporphyrinogen III, verläuft wie bereits erwähnt, bei allen bisher untersuchten Organismen, über identische Zwischenprodukte (Rüdiger und Schoch 1988; Richards, 1993). Im ersten Schritt erfolgt hierbei die Kondensation zweier Moleküle Aminolävulinsäure zu der fünfgliedrigen, zyklischen Verbindung Porphobilinogen. Diese Reaktion wird durch die 5-Aminolävulinsäure-Dehydratase (E.C. 4.2.1.24) katalysiert, die auch als Porphobilinogen-Synthase bezeichnet wird (Liedgens *et al.*, 1983; Stolz und Dörnemann, 1996).

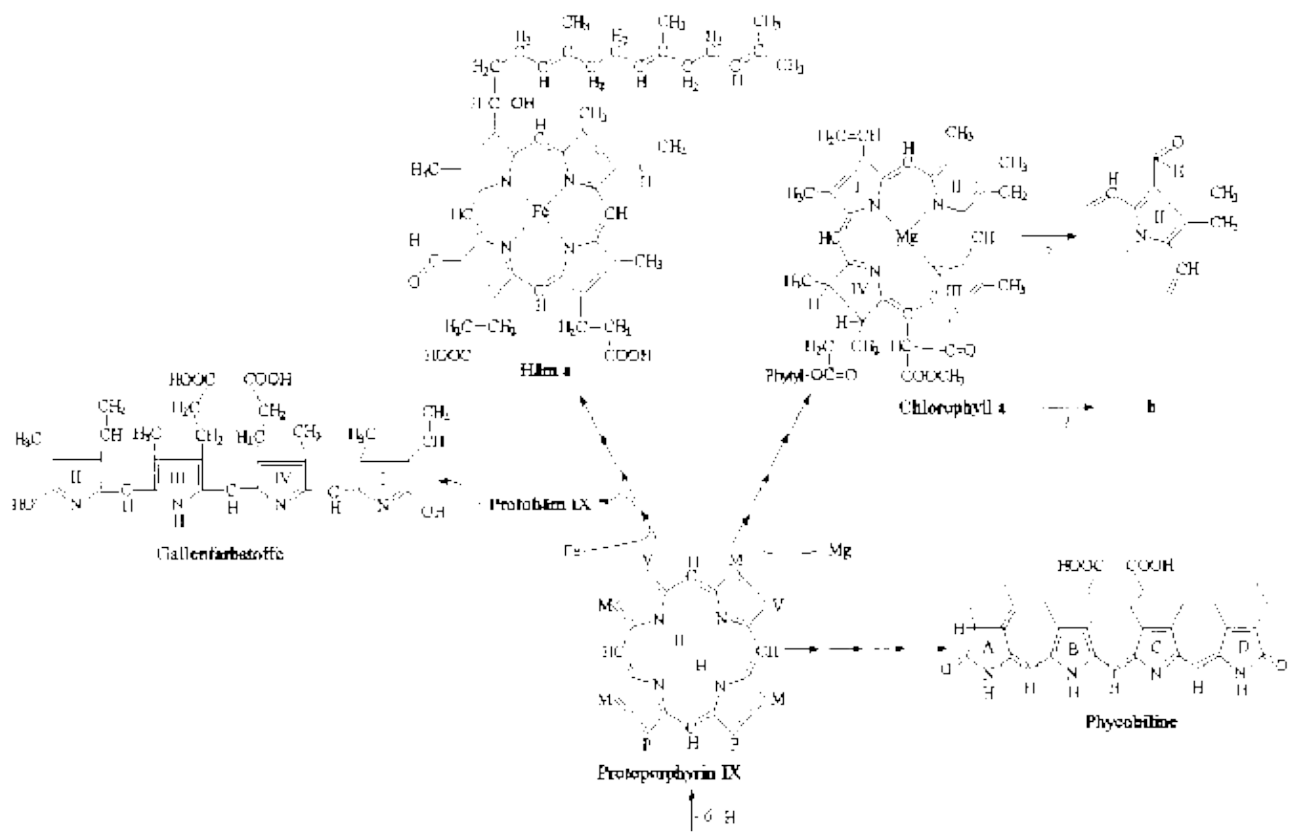
Vier Moleküle Porphobilinogen werden anschließend durch das Zusammenwirken zweier Enzyme zuerst zu dem linearen Tetrapyrrol Hydroxymethylbilan zusammengefügt und schließlich zu Uroporphyrinogen III zyklisiert. Die beiden beteiligten Enzyme sind die Porphobilinogen-Deaminase (E.C. 4.3.1.8) und die

Uroporphyrinogen-III-Synthase (E.C. 4.2.1.75) (Bogorad, 1958; Hart *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 1986).

Auf der Stufe des Uroporphyrinogens III kommt es dann zu einer Verzweigung der Synthesewege. Ein Weg führt über Precorrin-2 zu dem Kobalt-haltigen Corrinoid Vitamin B12 (Richards, 1993; Stamford, 1994). Ebenfalls über Precorrin-2 verläuft die Bildung des Sirohäms, der prosthetischen Gruppe der Nitrit- und Sulfitreduktasen. Hier erfolgt der Einbau von Eisen. Ausgehend von Precorrin-2 und über die Einführung von Nickel gelangt man zu dem Tetrapyrrol F430 einem Corphin der methanogenen Bakterien (Thauer und Bonnacker, 1994), das an der Methanbildung beteiligt ist.

Die Bildung von Protoporphyrin IX, ausgehend von Uroporphorinogen III, wurde in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen intensiv untersucht (Richards, 1993). Es treten identische Intermediate auf, unabhängig davon, ob das Protoporphyrin IX anschließend weiter in der Chlorophyll- oder der Häm-Biosynthese umgesetzt wird.

In Abb. 2 ist eine Übersicht über die Tetrapyrrolbiosynthese mit einigen ihrer Intermediate dargestellt.



Die Biosynthese der unterschiedlichen Tetrapyrrole ausgehend von der nicht-proteinogenen Aminosäure 5-Aminolävulinsäure (nach Venhaus, 1997).

13

## 1.2 Die Bildung von 5-Aminolävulinsäure

Der Biosynthese aller Tetrapyrrole beginnt mit der Bildung der nicht proteinogenen Aminosäure ALA. Es existieren zwei Biosynthesewege zu ihrer Bildung, der Shemin und der C<sub>5</sub>-Weg. Der phylogenetisch jüngere und zuerst entdeckte ist der Shemin-Weg (Shemin und Rittenberg, 1945; Shemin und Russel, 1953). Hier erfolgt in einem einzigen Schritt die Kondensation von Succinyl-CoA und Glycin zu ALA unter Abspaltung von CO<sub>2</sub>. Diese Reaktion wird durch die ALA-Synthase (E.C. 2.3.1.37) katalysiert. Der Shemin-Weg tritt in den Mitochondrien tierischer Zellen auf, sowie in Pilzen und in der  $\alpha$ -Gruppe der Proteobakterien (Avissar *et al.*, 1989; Gibson *et al.*, 1958; Kikuchi *et al.*, 1958). Die auf diese Weise in den Mitochondrien tierischer Zellen gebildete ALA wird weiter zu den verschiedenen Häm-Produkten umgesetzt. Bei der  $\alpha$ -Gruppe der Proteobakterien dient die ALA zur Bildung von Häm und Bakteriochlorophyll *a* (Richards, 1993).

Der ältere Weg zur Bildung von ALA ist der von Beale und Castelfranco (1973) gefundene C<sub>5</sub>-Weg. Die einzelnen Schritte und katalytischen Komponenten des C<sub>5</sub>-Weges zur Bildung von ALA werden in Kapitel 1.3 besprochen. In dem Phytoflagellaten *Euglena gracilis* (Weinstein und Beale, 1983) und in der Grünalge *Scenedesmus obliquus* (Klein und Senger, 1978; Klein *et al.*, 1980; Drechsler-Thielmann *et al.*, 1993) wurde sowohl der Shemin-Weg, als auch der C<sub>5</sub>-Weg nachgewiesen. In *Euglena gracilis* ist die über den C<sub>5</sub>-Weg synthetisierte 5-Aminolävulinsäure der Ausgangspunkt für die Bildung der plastidären Tetrapyrrole (Dzelzkalns *et al.*, 1982). Die nicht-plastidären Tetrapyrrole werden in diesem Organismus über den Shemin-Weg gebildet (Mayer *et al.*, 1987). Bei Untersuchungen an der Grünalge *Scenedesmus obliquus* wurde für die lichtabhängig ergrünende Mutante C-2A' nachgewiesen, daß sowohl bei Zusatz von radioaktiv markiertem Glutamat, wie auch nach der Zugabe von radioaktiv markiertem Glycin die Markierung im Prothäm wiedergefunden wurde. Die Markierung durch Glycin war geringer als die durch Glutamat. Durch die Hemmung des C<sub>5</sub>-Weges mittels des spezifischen Inhibitors Gabaculin konnte der Einbau von radioaktivem Glycin deutlich erhöht werden (Drechsler-Thielmann *et al.*, 1993).

### 1.3 Die Enzyme des C<sub>5</sub>-Weges

Die Entdeckung des C<sub>5</sub>-Weges gelang 1973 Beale und Castelfranco. Sie konnten an Gurke (*Cucumis sativus*) zeigen, daß <sup>14</sup>C-markiertes Glutamat, bzw. 2-Oxoglutarat als vollständiges Kohlenstoffgerüst in 5-Aminolävulinsäure eingebaut wird. Das C-1 des Glutamats wird dabei zum C-5 der ALA (Beale *et al.*, 1975; Klein und Senger, 1978). An der Umsetzung von Glutamat zu ALA sind drei Enzyme beteiligt (zur Übersicht siehe Smith und Griffith, 1993; Kannangara *et al.*, 1994): Glutamyl-tRNA-Synthetase (GluRS), Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR) und Glutamat-1-semialdehyd-2.1-Aminomutase (GSA-AM). Des weiteren wird eine tRNA<sup>Glu</sup> benötigt. In Abb. 3 sind Ablauf und katalytische Komponenten des C<sub>5</sub>-Weges dargestellt. Im Anschluß daran erfolgt eine detaillierte Beschreibung dieser katalytischen Komponenten.

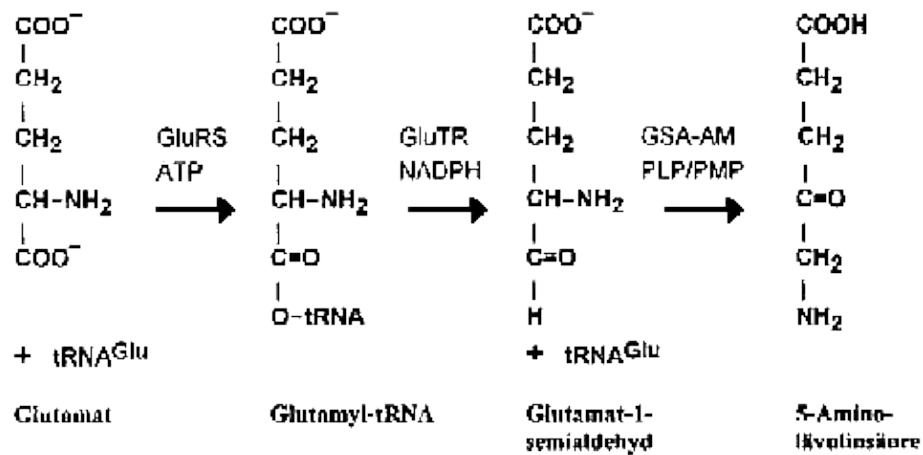


Abb. 3: Die Bildung von 5-Aminolävulinsäure über den C<sub>5</sub>-Weg.

#### 1.3.1 Die Glutamyl-tRNA-Synthetase und die tRNA<sup>Glu</sup>

Wie alle Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (ARS) katalysiert die Glutamyl tRNA-Synthetase (GluRS) die Beladung einer tRNA mit einer Aminosäure (AS), hier Glutamat. Dies ist die Hauptfunktion dieser Enzymklasse im Rahmen der Translation. Im C<sub>5</sub>-Weg katalysiert dieses Enzym in einem zweistufigen, ATP-abhängigen Reaktionsmechanismus ebenfalls die Anbindung von Glutamat an eine tRNA<sup>Glu</sup>. Die Glutamyl-tRNA<sup>Glu</sup> ist aber dann Substrat für ein Enzym, das das Glutamat zu Glutamat-1-semialdehyd reduziert. Bei der Beladung der tRNA werden Mg<sup>2+</sup>, ATP und Glutamat an das Enzym gebunden. Hierbei entsteht Pyrophosphat und ein Aminoacyladenylat, das als Aminoacyl-AMP (AS-AMP) bezeichnet wird. Im zweiten Schritt erfolgt die Übertragung der Aminoacylgruppe des Aminoacyl-AMP auf eine tRNA (Kannangara *et al.*, 1994). Für diese Reaktion läßt sich die folgende allgemeine Reaktionsgleichung formulieren:



Je nach der an der Reaktion beteiligten GluRS können Besonderheiten auftreten. Einige GluRS, wie z.B. das Enzym aus *Thermus thermophilus* (Hara-Yokoyama *et al.*, 1986), müssen zunächst die tRNA binden, um die richtige Konformation zur Anknüpfung des ATP und der Aminosäure (Hong *et al.*, 1996) einzunehmen. Alle Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysieren eine analoge Reaktion, bei der sie ATP als gemeinsames Substrat verarbeiten. Trotz dieser Gemeinsamkeiten weisen sie untereinander große Unterschiede im Hinblick auf Struktur, Größe und oligomeren Zustand auf (Eriani *et al.*, 1990; Moras, 1992). Glutamyl-tRNA-Synthetasen aus Chloroplasten von Höheren Pflanzen wurden bisher immer als Homodimere identifiziert, wobei molekulare Massen von 54 kDa für das Enzym aus Weizen (Ratinaud *et al.*, 1983) und 56 kDa für das aus Gerste (Bryant und Kannangara, 1987) gefunden wurden. Bei Algen wurden für *Chlamydomonas reinhardtii* ein Monomer von 62 kDa (Chen *et al.*, 1991) und für *Scenedesmus obliquus* ein Homodimer von 55 kDa beschrieben (Vothknecht *et al.*, 1994). Da in den Chloroplasten bisher jeweils nur eine GluRS nachgewiesen wurde, muß diese sowohl für die Anbindung des Glutamats an die tRNA im C<sub>5</sub>-Weg, als auch für die Bereitstellung der Aminosäure in der Proteinbiosynthese verantwortlich sein. Für die GluRS aus Chloroplasten (Schön *et al.*, 1988) ist bekannt, daß sie die tRNA<sup>Gln</sup> mit Glutamat fehlbeladen kann. Auch für die GluRS aus der Mutante C-2A' von *Scenedesmus* konnte gezeigt werden, daß sie die plastidäre tRNA<sup>Gln</sup> aus Gerste mit Glutamat fehlbelädt (Vothknecht *et al.*, 1994). Diese Fehlbeladung dient dazu, das Fehlen des Enzyms Glutaminyl-tRNA-Synthetase zu kompensieren. Anschließend erfolgt die Amidierung des an die tRNA<sup>Glu</sup> gebundenen Glutamats zu Glutamin (Strauch *et al.*, 1988; Jahn *et al.*, 1990). Die erste Kristallstruktur einer GluRS wurde 1995 für das Enzym *Thermus thermophilus* (Nureki *et al.*) aufgeklärt. Dabei wurde eine geometrische Ähnlichkeit der aminoterminalen Seite der GluRS zu der Glutaminyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* (Rould *et al.*, 1989) festgestellt. Beiden Enzymen gleich sind zwei Insertionen am aminoterminalen Ende, die spezifisch die tRNA erkennen. Manche Glutamyl-tRNA-Synthetasen können nach der Bindung falscher Aminosäuren diese durch Hydrolyse wieder abspalten (Schmidt und Schimmel, 1995).

Die von der Glutamyl-tRNA-Synthetase als Substrat verwendete tRNA<sup>Glu</sup> konnte bisher aus *Hordeum* (Schön *et al.*, 1986), *Chlamydomonas* (O'Neill *et al.*, 1991), *Synechocystis* 6803 (O'Neill *et al.*, 1988) und *Scenedesmus* (Willows *et al.*, 1995) isoliert werden. Die tRNA aus *Scenedesmus* wurde nicht charakterisiert, sondern nur auf ihre Aktivität hin getestet. Die tRNA<sup>Glu</sup> wird in den Chloroplasten durch das *trnE*-Gen kodiert. Mit Ausnahme von *Chlamydomonas reinhardtii* (Jahn *et al.*, 1992), wo zwei chloroplastidäre *trnE*-Gene gefunden wurden, traten in allen untersuchten Chloroplastengenomen nur einzelne Kopien des *trnE*-Gens auf (O'Neill *et al.*, 1991; Masuda *et al.*, 1992; Stange-Thomann *et al.*, 1994). Für die tRNA aus den Chloroplasten von Gerste (Schön *et al.*, 1988), *Chlamydomonas* (Jahn *et al.*, 1992) und *Euglena gracilis* (Stange-Thomann *et al.*, 1994) konnte gezeigt werden, daß diese sowohl am C<sub>5</sub>-Weg, als auch an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Die meisten tRNAs sind durchschnittlich aus 76 Nukleotiden aufgebaut und weisen eine typische Kleeblattstruktur auf. Dabei können vier Bereiche unterschieden werden: der Aminosäure-Arm, der Dihydrouridin-Arm (DHU-Arm), der Antikodon-Arm und der T

ψ C-Arm. Das 3'-Ende aller tRNAs liegt einzelsträngig vor und trägt am Ende die Sequenz CAAOH. Die Aminosäure wird an die 2'- oder 3'-OH Gruppe des Riboserestes des terminalen Adenosins gebunden. In Abbildung 4 ist stellvertretend für den Aufbau der tRNAs die tRNA<sup>Glu</sup> aus den Chloroplasten von Gerste mit ihren vier unterschiedlichen Bereichen als Kleeblattstruktur dargestellt.





### 1.3.2 Die Glutamyl-tRNA-Reduktase

Die Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR) katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion des tRNA-gebundenen Glutamats zu Glutamat-1-semialdehyd (GSA) unter Freisetzung einer intakten tRNA<sup>Glu</sup>. Dabei wird die Carboxylgruppe des aktivierten Glutamats zu einer Aldehydgruppe reduziert. Auffällig ist hierbei die hohe Spezifität des Enzyms für die Herkunft der umgesetzten tRNA. Stammt die angebotene, beladene tRNA<sup>Glu</sup> aus einem anderem Organismus, so wird sie gar nicht oder nur geringfügig umgesetzt (Avisar und Moberg, 1995). Bei *Chlamydomonas reinhardtii* konnte die Bildung eines stabilen Komplexes aus Glutamyl-tRNA und Glutamyl-tRNA-Reduktase beobachtet werden, der nach der Reduktion des tRNA-gebundenen, aktivierten Glutamats zum Glutamat-1-semialdehyd dissoziiert (Jahn, 1992). Allen bisher untersuchten Reduktasen gemein ist ihre geringe Stabilität. Dies ist der Grund dafür warum bis heute erst wenige GluTR gereinigt werden konnten. Das Enzym ist auf dem *hemA*-Gen kodiert das im Kern lokalisiert ist. Aus *Chlamydomonas reinhardtii* wurde ein monomeres Enzym einer molekularen Masse von 130 kDa gereinigt (Chen *et al.*, 1990). In *Escherichia coli* wurden in aerob angezogenen Zellen zwei Enzyme mit den Massen 45 bzw. 85 kDa gefunden (Jahn *et al.*, 1991), obwohl nur ein *hemA*-Gen, das für ein 46 kDa Protein kodiert, identifiziert wurde. Die gereinigte GluTR aus *Bacillus subtilis* besteht aus mehreren Untereinheiten mit einer molekularen Masse von 50 kDa (Petricek *et al.*, 1990). Das aus den Chloroplasten von *Hordeum vulgare* isolierte Enzym besitzt eine molekulare Masse von 270 kDa und besteht aus fünf Untereinheiten von je 54 kDa (Pontoppidan und Kannangara, 1994). Obwohl alle Glutamyl-tRNA-Reduktasen der Klasse der Oxidoreduktasen angehören, gibt es außer der oben erwähnten geringen Stabilität und der Abhängigkeit von dem für die Reaktion notwendigen Cofaktor NADPH wenig Gemeinsamkeiten. Die aus *Hordeum vulgare* isolierte GluTR wird durch Häm, sowie die Schwermetalle Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> und Cd<sup>2+</sup> inhibiert (Pontoppidan und Kannangara, 1994). Die Enzyme aus *Chlorella vulgaris* und *Synechocystis* sp. PCC 6803 werden durch Mg<sup>2+</sup> stimuliert und durch EDTA gehemmt. Im Fall von *Chlorella vulgaris* wurden Hinweise auf die Möglichkeit einer Substitution des Mg<sup>2+</sup> durch Mn<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> beobachtet. Eine ganze Reihe von *hemA*-Genen konnte bisher aus Bakterien kloniert und sequenziert werden (Kannangara *et al.*, 1994; Avisar und Moberg 1995; Vothknecht *et al.*, 1996). Aus Höheren Pflanzen konnte das *hemA*-Gen, teilweise in mehreren Kopien, aus den in Tabelle 1 aufgeführten Pflanzen kloniert und sequenziert werden. Aus Grünalgen konnte bisher kein *hemA*-Gen isoliert werden. Der Begriff *hemA*-Gen wird irreführend auch für das Gen, welches für die ALA-Synthase des Shemin-Weges kodiert, verwendet (Avisar und Moberg, 1995). Die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung *hemA*-Gen bezieht sich aber ausschließlich auf das für die GluTR kodierende Gen.

Organismus	Gene Bank accession no.	Autoren
Arabidopsis thaliana	U03774	Ilag <i>et al.</i> , 1994
Arabidopsis thaliana	U27118	Kumar <i>et al.</i> , 1995 (Direct Submission)
Cucumis sativus	D67088	Tanaka <i>et al.</i> , 1996

Cucumis sativus	D50407	Tanaka R. 1996 (Direct Submission)
Hordeum vulgare	X86101	Bougri <i>et al.</i> , 1995
Hordeum vulgare	X92403	Bougri O. 1996 (Direct Submission)

Tab. 1:

Aufstellung der bisher aus Höheren Pflanzen klonierten *hemA*-Gene und ihre zugeordnete "Gene Bank accession number".

Während die abgeleiteten Genprodukte der *hemA*-Gene von Bakterien molekulare Massen zwischen 46 und 51 kDa haben und untereinander eine Sequenzhomologie von 60 % aufweisen, zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz von *Arabidopsis thaliana* im Vergleich zu den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der bakteriellen *hemA*-Gene nur Identitäten von 30 bis 47 % (Ilag *et al.*, 1994).

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der GluTR dreier Höherer Pflanzen zeigen eine Sequenzidentität von ca. 70 % (Vothknecht, 1996). Bei Sequenzvergleichen auf Aminosäureebene zwischen acht bakteriellen und pflanzlichen Glutamyl-tRNA-Reduktasen konnte eine Identität von 70 % für einen 27 Aminosäuren umfassenden Sequenzabschnitt gefunden werden, dessen Funktion noch nicht geklärt ist (Pontopiddan und Kannangara, 1994). Die *hemA*-Gene der Höheren Pflanzen besitzen im Gegensatz zu den *hemA*-Genen, die bisher aus Prokaryonten identifiziert werden konnten, einen zusätzlichen, aminoterminalen Sequenzabschnitt. Dabei handelt es sich möglicherweise um die Sequenz des Transitpeptides für den Transfer der GluTR in den Plastiden (Ilag *et al.*, 1994; Pontopiddan und Kannangara, 1994).

In dem Bakterium *Escherichia coli* wurden, wie bereits erwähnt, zwei Enzyme mit der molekularen Masse von 46 und 85 kDa mit Glutamyl-tRNA-Reduktase-Aktivität gefunden (Jahn *et al.*, 1992). Es wurde aber lediglich das für das 46 kDa große Protein kodierende *hemA*-Gen gefunden was die Existenz eines zweiten *hemA*-Gens wahrscheinlich erscheinen läßt (Avisar und Moberg, 1995). Die Existenz von zwei unterschiedlich regulierten *hemA*-Genen in einem Organismus wurde in jüngerer Zeit für die Höheren Pflanzen *Cucumis sativus* (Tanaka *et al.*, 1996) und *Arabidopsis thaliana* (Ilag *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 1996) beschrieben. Die beiden Gene werden bei *Cucumis*, wie auch bei *Arabidopsis*, als *hemA* 1 und *hemA* 2 bezeichnet. Die oben genannten Autoren postulieren aufgrund der zwei *hemA*-Gene zwei unterschiedlich regulierte C<sub>5</sub>-Wege. Der eine C<sub>5</sub>-Weg soll lichtinduziert und die GluTR durch das *hemA* 1-Gen kodiert sein und hauptsächlich für die Chlorophyllbildung genutzt werden. Der zweite C<sub>5</sub>-Weg sei lichtunabhängig und werde für die Synthese von Tetrapyrrolen benutzt, die in nicht-ergrünenden Teilen der Pflanze benötigt werden. Die Sequenzen des *hemA* 2-Gens wurden in den oben genannten Organismen überwiegend in photosynthetisch inaktiven Pflanzenteilen, wie Wurzeln und Hypokotyl, aber nur in sehr geringem Maße in Cotyledonen gefunden.

Auch für diesen Teil des C<sub>5</sub>-Weges existiert auf der Stufe der GluTR die Möglichkeit der Regulation dieses Biosyntheseweges. Ein möglicher Mechanismus der Regulation wäre eine Feedback-Hemmung durch Häm. In Versuchen an *Hordeum vulgare* und *Synechocystis* konnte gezeigt werden, daß Häm-Konzentrationen oberhalb von 3 µM die Aktivität der GluTR in beiden Organismen hemmen (Kannangara *et al.*, 1994). Ferner

konnte für *Hordeum vulgare* eine lichtabhängige Transkription der für die GluTR kodierenden *hemA*-Gene nachgewiesen werden. Der Gehalt der Transkripte der *hemA*-Gene steigt bei Belichtung von etiolierten Keimlingen von *Hordeum vulgare* bis zur vierten Stunde an, um erst nach sechzehn Stunden Licht wieder abzunehmen (Bougri *et al.*, 1996a, 1996b). Neben *Hordeum vulgare* konnte diese lichtabhängige Transkription des *hemA* 1-Genes auch für *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden (Ilag *et al.*, 1994).

### 1.3.3 Die Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSA-AM)

Der aus der GluTR-Reaktion resultierende Glutamat-1-semialdehyd wird durch die Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSA-AM) zu ALA umgesetzt. Diese Reaktion stellt die Pyridoxal/Pyridoxamin-5'-phosphat abhängige Umlagerung einer Aminogruppe dar. Das Enzym pendelt im Verlauf der Reaktion zwischen der Pyridoxalphosphat- (PLP) und Pyridoxaminphosphat- (PMP) Form hin und her (Kannangara *et al.*, 1994). Als mögliche Zwischenprodukte der Reaktion wurden sowohl 4,5-Dioxovalerat (DOVA, Breu und Dörnemann, 1988), als auch 4,5-Diaminovalerat (DAVA, Hooper *et al.*, 1988) diskutiert. Durch Untersuchungen an der in *Escherichia coli* überexprimierten GSA-AM aus *Synechococcus* (Grimm *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1991) konnte gezeigt werden, daß DOVA ein alternatives Substrat zu GSA darstellt. Die Transaminierung erfolgt über einen Bi-Bi Ping-Pong Mechanismus (Abb. 5). Durch Zugabe von GSA oder DOVA wird das Enzym in die PLP-Form umgewandelt, durch Zusatz von DAVA in die PMP-Form.

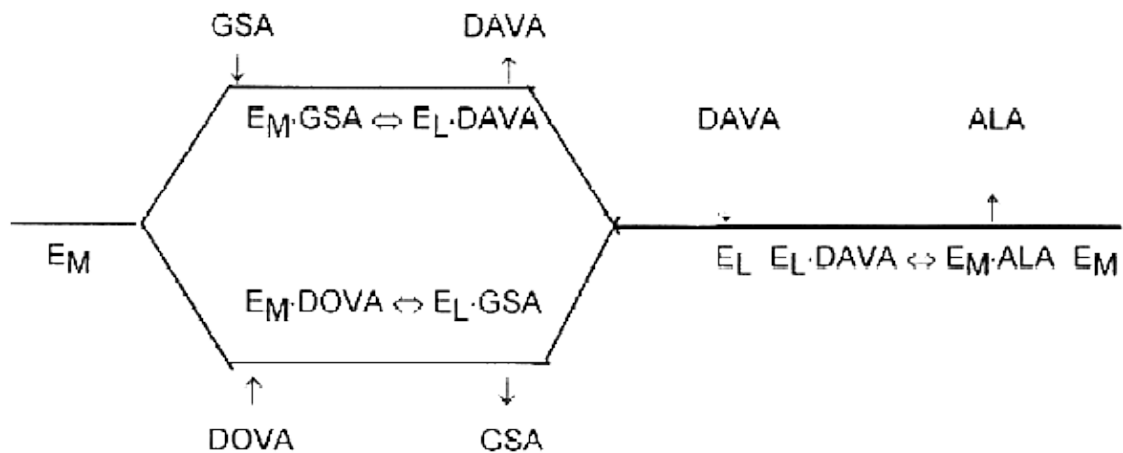


Abb. 5:

Der Bi-Bi Ping-Pong-Reaktionsmechanismus (Smith *et al.*, 1991). EM ist die Pyridoxaminphosphat-Form, EL die Pyridoxalphosphat-Form der GSA-AM.

Die GSA-AM setzt enantioselektiv (S)-GSA um (Smith *et al.*, 1992; Friedmann *et al.*, 1986), der ausgehend von L-Glutamat gebildet wird. Die Reaktion wird u.a. durch Gabaculin, 4-Amino-5-Fluoropentansäure und Glutamat-5-Monohydroxamat (Gough *et al.*, 1989) inhibiert. Es wurden verschiedene GSA-AM aus unterschiedlichen pflanzlichen und bakteriellen Quellen gereinigt. Die Enzyme aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Jahn *et al.*, 1990) und *Synechococcus PCC 6301* (Grimm *et al.*, 1991) stellen Monomere einer Größe von 43 kDa bzw. 46 kDa dar. In Gerste (Wang *et al.*, 1981) und *Escherichia coli* (Ilag *et al.*, 1991) wurden Dimere mit einer molekularen Masse von 80 kDa gefunden. Bei Untersuchungen an der Grünalge *Scenedesmus obliquus* konnte eine GSA-AM mit einer nativen Größe von 94 kDa nachgewiesen werden, bei der es sich um ein Homodimer aus Untereinheiten einer molekularen Masse von 46 kDa handelt (Stolz, 1995).

Für die Enzyme aus Gerste (Grimm, 1990) und *Synechococcus* wurde eine Identität der Aminosäuresequenz von 72% ermittelt. Die aus dem Gen abgeleitete Aminosäuresequenz der GSA-AM aus *Scenedesmus obliquus* wies hohe Identitäten mit den Enzymen aus *Chlamydomonas* (82%) und *Synechococcus* (73%) auf. In Gerste wird die GSA-AM im Cytoplasma als Vorläuferprotein einer Größe von 48,5 kDa synthetisiert und dann in die Chloroplasten transportiert, wobei ein Transitpeptid von 34 Aminosäuren abgespalten wird (Kannangara *et al.*, 1994).

## 2. Problemstellung

Das erste Enzym der Reaktionssequenz des C<sub>5</sub>-Weges, die Glutamyl-tRNA-Synthetase, konnte aus der einzelligen Grünalge *Scenedesmus obliquus* bereits zur Homogenität gereinigt und charakterisiert werden (Vothknecht, 1993). Auch das dritte und letzte Enzym des C<sub>5</sub>-Weges, die Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase konnte gereinigt und ihr Gen kloniert werden (Stolz, 1995). Ein erstes Ziel dieser Arbeit ist es, das Bindeglied zwischen den oben genannten Enzymen, die Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR), die das durch die Bindung an die tRNA<sup>Glu</sup> aktivierte Glutamat zu Glutamat-1-Semialdehyd reduziert, zu charakterisieren und gegebenenfalls zu reinigen. Im Falle des Scheiterns der Reinigung, die bisher in nur wenigen Fällen gelang (Avissar und Moberg 1995), sollte ein nächstes Ziel sein, das Gen der GluTR zu klonieren und eine erste Charakterisierung des Proteins über die Nukleinsäuresequenz zu erzielen.

Zur Reinigung der GluTR soll, ausgehend von ersten Befunden zu diesem Enzym aus *Scenedesmus* (Breu, 1988), zunächst der für das Enzym aus Gerste etablierte, kombinierte Enzymtest auf *Scenedesmus* übertragen werden.

Mit Hilfe des bereits für eine erste Anreicherung der anderen Enzyme des C<sub>5</sub>-Weges verwendeten seriellen Affinitätssäulen-Systems soll auch eine erste Anreicherung der GluTR angegangen werden. Im Falle eines Erfolges sollen sich weitere Reinigungsschritte über noch zu ermittelnde Säulenmatrizes anschließen um das Protein weiter zu reinigen und zu charakterisieren.

Die GluTR aus Pro- und Eukaryonten ist auf dem *hemA*-Gen kodiert. Mit Hilfe von *hemA*-Gen defizienten Punkt- und Deletionsmutanten von *E. coli* soll überprüft werden, ob diese Mutation durch eine DNA des zu untersuchenden Organismus zu komplementieren ist.

Derzeit sind überwiegend *hemA*-Gen Sequenzen aus Prokaryonten veröffentlicht. Ausgehend von diesen Sequenzen sollen Oligonukleotide abgeleitet und in einer Polymerasekettenreaktion eingesetzt, die erhaltenen PCR-Produkte amplifiziert und diese als homologe Sonde zum Screenen der vorhandenen cDNA-Banken eingesetzt werden. Positive Klone sollen isoliert und durch DNA-Sequenzierung charakterisiert werden. Die gewonnenen Ergebnisse sollen erste Aufschlüsse über die Struktur des Enzyms geben und Grundlage für Untersuchungen zum Mechanismus und der Regulation der GluTR sein.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Organismen und Anzucht

##### 3.1.1 Die einzellige Grünalge *Scenedesmus obliquus*

Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit ist die einzellige Grünalge *Scenedesmus obliquus*. Sie gehört zur Ordnung der Chlorococcales und kommt in praktisch allen Süßgewässern vor.

Die Zellen, die ca. 10 µm groß sind, enthalten nur einen, irregulär geformten Chloroplasten, der den größten Teil des Zellvolumens ausmacht. Die Zellmembran ist umgeben von einer Zellwand aus Zellulose, Pektin und Sporopollenin, das für die hohe mechanische Stabilität der Zellen verantwortlich ist (Bisalputra und Weier, 1963; Atkinsen *et al.* 1972).

Die Vermehrung von *Scenedesmus* erfolgt asexuell durch Bildung von Autosporen (Uherkovich, 1966). Der Wildstamm D<sub>3</sub> von *Scenedesmus obliquus* (Gaffron 1939) bildet Chlorophyll, wie alle Algen, lichtunabhängig und kann heterotroph kultiviert werden (Oltmanns 1905).

Neben dem Wildtyp wurde vor allem die Mutante C-2A eingesetzt, die durch Bestrahlung des Wildstammes D<sub>3</sub> mit Röntgenstrahlen erzeugt wurde (Bishop, 1971).

Die Mutante C-2A zeigt eine lichtabhängige Chlorophyllbiosynthese, während die Carotinoidbiosynthese, wie im Wildtyp, lichtunabhängig ist. Während der Ergrünung synthetisiert diese Mutante alle Pigmente des Wildtyps, baut einen vollständigen Photosyntheseapparat auf und zeigt nach der vollständigen Ergrünung eine Photosynthesekapazität und ein Pigmentmuster wie der Wildtyp (Bishop 1971; Bishop und Senger, 1971; 1972; Brinkmann und Senger, 1978; 1979; Senger und Straßberger, 1978; Wellburn *et al.* 1980; Senger *et al.*, 1993).

#### Anzucht der Algen

Die Anzucht der Algen erfolgte steril bei 33 °C in 500 ml Erlenmeyerkolben mit je 250 ml Nährmedium, bzw. in 2 l Erlenmeyerkolben mit 750 ml Nährmedium, heterotroph im Dunkeln. Als Nährmedium diente das von Bishop und Senger (1971) veränderte Medium nach Kessler *et al.*, (1957), dem 1 ml /l die Spurenelementlösung A<sub>5</sub> nach Kratz und Mayers (1955) hinzugefügt wurde. Für die heterotrophe

Anzucht wurden zusätzlich 0,5 % (w/v) Glukose und 0,25 % (w/v) Hefeextrakt hinzugefügt (Bishop und Wong, 1971).

Die Anzucht erfolgte für drei Tage in einem thermostatisierten Schüttelinkubator (New Brunswick, Scientific Inc., New Brunswick USA). Die Kultur befand sich dann am Ende der logarithmischen Wachstumsphase

(Brinkmann und Senger, 1979, 1980, Wellburn *et al.*, 1980). 250 ml Medium wurden mit 15, 750 ml Medium mit 30 ml einer 3-4 d alten Kultur angeimpft. Stammkulturen wurden auf Schrägagar kultiviert. Der Schrägagar enthält 2 % (w/v) Hefeextrakt in anorganischer Nährlösung. Die Dauerkulturen wurden im Dunkeln bei 30 °C gehalten. Nach Übergang von Agarkulturen in Flüssigkultur wurden die Zellen mindestens zweimal für 3 d in Flüssigmedium kultiviert, ehe sie für die Versuche eingesetzt wurden.

### Belichtung der Algen

Für Ergrünungsexperimente wurden heterotroph angezogene Kulturen von *Scenedesmus obliquus*, Mutante C-2A in Kulturröhren von 42 cm Länge und 3,7 cm Innendurchmesser überführt und in einem Lichtthermostaten (Kniese, Marburg) bei 28 °C mit weißem Mischlicht einer Intensität von 20 W m<sup>-2</sup> belichtet. Als Lichtquelle dienten 10 Neonröhren (Osram, Berlin), die waagrecht in einem Abstand von 20 cm vor den Kulturen angebracht waren. Um eine gleichmäßige, spektrale Verteilung zu erhalten, wurden 5 Leuchten des Typs LL 40 W/25-1 (Universal Weiß) und 5 des Typs I 40 W/19-1 (Tageslicht) eingesetzt. Die Begasung erfolgte mit Luft, der 3 % (v/v) CO<sub>2</sub> zugemischt wurde. Durch die Begasung vom Boden der Röhre her wurde zusätzlich das Sedimentieren der Algen verhindert.

### 3.1.2 Dunkelanzucht von Gerste (*Hordeum vulgare* L.)

Die Gerste (*Hordeum vulgare* L., Sorte Carina) wurde auf feuchtem Vermiculit (Deutsche Vermiculit Sprockhöfel) ausgesät. Das Auftreiben der Saat erfolgte bei Raumtemperatur und absoluter Dunkelheit. Die etiolierten Keimlinge wurden nach 5-6 Tagen unter Grünlicht geerntet. Die Pflanzen hatten dann eine Größe von 4-7 cm erreicht und zeigten ein entfaltetes Keimblatt. Geerntet wurde der Kotyledonen- bereich, also die obersten 2-4 cm der Pflanze.

### 3.1.3 Die Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgte, je nach dem späteren Verwendungszweck der Bakterien, in sterilem LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5), in sterilem NZY-Medium (5 g/l NaCl, 10 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,5) oder in sterilem 2 x YT-Medium (1 g /l Bacto-Trypton, 16 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5). Die Medien wurden mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 15 g/l Agar (1,5 % (w/v)) bzw. 7,0 g/l



Agarose (0,7 % (w/v)) als Top-Agarose zugesetzt. Weitere Zusätze, wie Antibiotika (Tetracyclin 12,5 µg/ml, Ampicillin 50-100 µg/ml), IPTG (8 µg/ml), X-Gal (40 µg/ml), MgSO<sub>4</sub> (10 mM Endkonzentration) und Maltose (0,2 % (w/v)) wurden in Form von sterilfiltrierten Stammlösungen zugesetzt. Größere Kulturmengen (100 ml oder 250 ml Medium) wurden mit 2 bzw. 5 ml stationärer Vorkultur angeimpft und ca. 16 h bis zum Erreichen der stationären Phase (OD<sub>600</sub> ca. 1,5) bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, USA) bei 250 U/min kultiviert. *E. coli*-Bakterien, die mit dem Bakteriophagen Lambda infiziert werden sollten, wurden in LB-Medium in Gegenwart von 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2 % (w/v) Maltose über Nacht angezogen, nach Zentrifugation (1400xg für 10 min) in der Hälfte des Kulturvolumens 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung resuspendiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### Herstellung von Gefrierkulturen von *E.coli*

1 ml Medium wurde mit einer *E. coli*-Kolonie von einer Platte beimpft und die Kultur unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 inkubiert. Dann wurde 0,5 ml frisches, jedoch zur Hälfte aus Glycerin bestehendes Medium zugesetzt und gut durchmischt. Die resultierende Bakteriensuspension wurde aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70 °C gelagert.

#### 3.1.4 Anzucht von Bakteriophagen

Für das Screening der cDNA-Bibliotheken im Lambda ZAP II Expressions-Vektor (Kap. 3.7.4) mit cDNA aus Dauerlicht- (LL) und Dauerdunkel- (DD) Zellen von *Scenedesmus obliquus* (Richter, 1994) wurde zuerst der Titer der Bibliotheken bestimmt. Zur Titerbestimmung wurden je 10 µl der originalen Phagensuspension der Bibliotheken entnommen und in eine Mischung aus 990 µl SM-Puffer (50 mM Tris/HCl, (pH 7,5), 100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,01 % Gelatine) und 50 µl Chloroform gegeben. Dies entspricht einer Verdünnung von 1:100. Die so erhaltenen Phagensuspensionen wurden in weiteren Schritten jeweils 1:10 verdünnt. Von jeder Suspension dieser Verdünnungsreihe wurden jeweils 10 µl mit 200 µl aus einer *E.coli*-XL1-Blue-Zellsuspension vereinigt. Die Gemische wurden unter langsamem Schwenken für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz 4 ml auf 48 °C temperierter Top-Agar (LB-Medium mit 0,7 % Agarose) zugegeben und diese Suspension auf LB-Platten ausplattiert. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die gebildeten Phagenplaques ausgezählt und so der Titer der Bibliothek bestimmt. Für das Screening der cDNA-Banken durch Phagenhybridisierung (Kap. 3.7.4) wurde eine solche Phagenverdünnung ausgewählt, daß pro Platte etwa 500-1000 Plaques zu erwarten waren. Mit dieser Verdünnung wurden, wie oben beschrieben, Agar-Platten hergestellt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 3.1.5 Entsorgung von Mikroorganismen

Bakterien und Bakteriophagen, sowie alle mit ihnen in Berührung gekommen Gegenstände und Lösungen, wurden vor ihrer Entsorgung bzw. Wiederverwendung 45 min bei 121 °C autoklaviert und die Bakterien so abgetötet. Die Oberflächensterilisation von Laborbänken, UV-Schirmen etc. erfolgte mit 70 %-igem Alkohol.

### 3.2 Bestimmung von Bezugsgrößen

#### 3.2.1 PCV-Bestimmung

Das Volumen dichtest gepackter Zellen (Packed Cell Volume) als ein schnell zugänglicher Parameter für die Dichte einer Algenkultur wurde durch Zentrifugation einer definierten Menge Algensuspension für 10 min bei 1400xg (Labofuge II, Heraeus Christ, Osterode) in Hämatokritröhrchen bestimmt. Das PCV konnte direkt an dem geeichten Kapillaransatz abgelesen werden und wurde als µl PCV/ml Zellsuspension ausgedrückt (Senger, 1970).

#### 3.2.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes von Proben erfolgte entweder nach der Methode von Lowry (1951) oder mit Hilfe des sensitiveren BCA-Assays (Smith *et al.*, 1985). Die Extinktion der Proben wurde in einem Zweistrahlphotometer (Spectrophotometer MPS-200, Shimadzu-Europa, Duisburg) bestimmt. Vor jeder Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen an Rinderserum-Albumin (Stammlösung 1 mg/ml) aufgenommen, anhand derer der Proteingehalt der eingesetzten Probe bestimmt wurde. Proben, die größere Mengen reduzierender Reagenzien enthielten, wurden vor der Proteinbestimmung durch Zugabe von Aceton (80% (v/v) Endkonzentration) bei -20 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 25000xg und 0 °C wurden die Proben in 1 % (w/v) SDS-Lösung resuspendiert und ein Aliquot der Lösung zur Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay eingesetzt. Der Proteingehalt wurde in µg Protein/ml Lösung angegeben.

#### 3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen

Der Gehalt von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde spektralphotometrisch durch die Bestimmung der Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die RNA-, DNA- bzw. Oligo-Nukleotid-Konzentration wurden daraus nach Sambrook *et al.*, (1989) errechnet, wobei folgende Formeln verwendet wurden :

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = 40 \times E_{260}$$

$$\text{DNA } [\mu\text{g/ml}] = 50 \times E_{260}$$

$$\text{Oligo-Nukleotide } [\mu\text{g/ml}] = 20 \times E_{260}$$

Die Reinheit der Proben wurde durch eine zusätzliche Messung der Extinktion bei 280 nm und 310 nm kontrolliert. Eine Extinktion bei 280 nm wird im wesentlichen durch Proteine verursacht, während eine Extinktion bei 310 nm eine Kontamination mit Kohlenhydraten anzeigt. Der Quotient  $E_{260/280}$  liegt bei reinen Nukleinsäurelösungen zwischen 1,8 und 2,0 (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.3 Bestimmung einiger Enzymaktivitäten des C<sub>5</sub>-Weges

#### 3.3.1 Die Messung der Glutamyl-tRNA-Synthetase-Aktivität

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Glutamyl-tRNA-Synthetase erfolgte nach der Methode von Kannangara *et al.*, (1984) in 100 mM Tricin-Puffer, pH 7,9. Der Testansatz enthielt zwischen 10 und 100 µl Enzymlösung, 100 µg tRNA-Gesamtpräparation (Kap. 3.4.2.5), 1 mM ATP und 0,25 µCi L-[U-<sup>3</sup>H]-Glutamat (50 µCi/mmol). Das Volumen des Testgemisches variierte zwischen 100 und 500 µl. Der Ansatz wurde 15 min bei 30 °C unter Schütteln in einem Wasserbad inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen eiskalter, 100 %-iger (w/v) TCA gestoppt. Das Präzipitat wurde auf Glasfaserfiltern G25 (Schleicher & Schüll, Dassel) gesammelt und zuerst mit etwa 6 ml eiskalter, 10 %-iger (w/v) TCA und dann mit eiskaltem Ethanol gewaschen. Der Filter wurde in einem Szintillationsfläschchen mit 5 ml Ready Safe-Szintillationscocktail (Beckmann, München) versetzt und anschließend in einem Szintillationszähler Betamatic II (Kontron, Neufahrn) die auf dem Filter verbliebene TCA-unlösliche Radioaktivität gemessen.

#### 3.3.2 Versuche zur Beladung von tRNA mit radioaktivem 2-Oxoglutarat

500 µg tRNA wurden mit 50-100 µg Protein aus einer Blue-Sepharose (Kap. 3.4.2.2) oder Matrex-Gel-Red-A-Präparation (Kap. 3.4.2.3) in Gegenwart von 1 mM ATP 30 min bei 28 °C in Tricin-Puffer inkubiert (Kap. 3.3.1). Als Substrat wurden 0,1 µCi [U-<sup>14</sup>C]-KG zugegeben. Das Testvolumen variierte zwischen 0,3 und 0,5 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe von soviel 100 %-iger TCA (w/v) gestoppt, daß die Reaktionsmischung eine Endkonzentration von 10 % hatte. Das Präzipitat wurde anschließend wie in Kap. 3.3.1. beschrieben, abfilteriert und die Radioaktivität bestimmt.

#### 3.3.3 Die Messung der Glutamyl-tRNA-Reduktase-Aktivität

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR) erfolgte nach der Methode von Pontoppidan und Kannangara (1994). Bei diesem Test handelt es sich um einen gekoppelten Enzymtest, bei dem Blue- Sepharose-Präparationen (Kap. 3.4.2.2) mit den Nukleotid-Cofaktor abhängigen Enzymen Glutamyl-tRNA-Synthetase- und Reduktase mit Präparationen aus dem Durchlauf des Affinitäts-säulensystem (Run off column, Roc) mit dem Enzym Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase eingesetzt werden. Das Reaktionsgemisch bestand aus 0,1 M Tricine, pH 8, 0,3 M Glycerin, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM NADPH, 0,25 µCi [U-<sup>14</sup>C]-Glutamat, 30 bis 60 µg Gesamt-tRNA-Fraktion (Chlorophyllin-Sepharose-Eluat), 20 bis 50 µg der Roc-Fraktion und 5 bis 15 µl der zu untersuchenden Blue-Sepharose Fraktion (Kap.3.4.2.2) und wurde in 50 bis 100 µl des vorgelegten Reaktionspuffer gegeben. Der Reaktionsmix wurde für 40 min bei 28 °C inkubiert und anschließend unter Zugabe von 6 µl einer 7 %igen Perchlorsäure-Lösung auf Eis gekühlt.

Das entstehende Präzipitat wurde 20 min bei 20 000xg zentrifugiert und der Überstand über HPLC-Auftrennung analysiert.

Dazu wurde eine ET 250/4 Nucleosil 100.5 C<sub>18</sub> Säule mit 5 µm Partikelgröße (Macherey und Nagel, Düren) verwendet. Die Säule wurde mit 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3,0, 6 mM SDS und 1 % t-Amylalkohl äquilibriert. Proben von 20 µl wurden auf die Säule aufgegeben und mit einer Flußrate von 1 ml/min bei Raumtemperatur eluiert. Das Eluat wurde mit einem Durchflußzähler Ramona 90 (Raytest, Straubenhardt) analysiert und mit der PC-Software Ramona 6 (Nuclear Interface, Münster) ausgewertet. Die Reaktionsprodukte wurden anhand ihrer Retentionszeiten und im Vergleich mit käuflicher radioaktiv markierter ALA identifiziert.

### 3.4 Anreicherung und Reinigung von Enzymen des C<sub>5</sub>-Weges

#### 3.4.1 Herstellung eines zellfreien Rohhomogenates

Für jeden Versuchsansatz wurden 4,5 l heterotroph angezogener Algenkulturen der *Scenedesmus*-Mutante C-2A für 6 h, wie in Kap. 3.1.1 beschrieben, belichtet. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 1400xg in einer Labofuge II (Heraeus Christ, UJ III) abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann mit Aufbruchmedium, bestehend aus 0,1 M Tricin/NaOH, 0,3 M Glycerin, 25 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM DTT, pH 9, einmal gewaschen und anschließend darin resuspendiert. Die Algensuspension wurde in einen 200 ml Aufbruchbecher gefüllt, der Becher mit Glasperlen (Durchmesser 0,7 mm) bis zum Becherrand aufgefüllt und 10 min in einer auf 4 °C gekühlten Vibrogen-Zellmühle TYP Vi 2 (E. Bühler, Tübingen) aufgebrochen. Die auftretenden, hohen Scherkräfte zerstören dabei die durch Sporopollenin-Einlagerungen sehr widerstandsfähigen Zellwände (Senger und Mell, 1977) der Algen. Das Rohhomogenat wurde durch Absaugen über eine Glasfilternutsche der Porengröße G1 von den Glasperlen abgetrennt und 1 h in einer Ultrazentrifuge (Centrikon T-1800, Kontron, Neufahrn) bei 300000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort auf Eis gekühlt, und für weitere Reinigungsschritte eingesetzt.

#### 3.4.2 Anreicherung von Komponenten des C<sub>5</sub>-Weges durch ein serielles Säulenchromatographiesystem

Alle säulenchromatographischen Schritte zur Auftrennung der Proteine wurden bei 4 °C in einem Kältelabor durchgeführt. Das Säulensystem wurde mit einer Peristaltikpumpe Pump P1 betrieben. Die Proteindetektion erfolgte mit einem UV-Durchflußmonitor Uvicord S II bei 280 nm. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler FRAC-100 fraktioniert aufgefangen (alle Geräte Firma Pharmacia LKB, Freiburg).

##### 3.4.2.1 Gelfiltration über TSKgel Toyopearl HW-55 F

Der erste Schritt zur Reinigung der Enzyme des C<sub>5</sub>-Weges und seiner tRNA-Komponente erfolgte über die Molekularsiebmatrix Toyopearl HW-55 F. Die Trennmatrix (Säulendimension 5,4 x 50 cm) wurde nach Herstellerangaben (Tosohaas, Stuttgart) vorbereitet und mit 0,1 M Tricin Puffer (0,1 M Tricin/NaOH-Puffer, pH 9, 3 M Glycerin, 1 mM DTT, 25 mM MgCl<sub>2</sub> äquilibriert). Das zellfreie Rohhomogenat wurde auf die Säule aufgetragen und die Proteine bei einer konstanten Flußgeschwindigkeit von 100 ml/h mit dem oben genannten Tricin-Puffer eluiert. Die zuerst eluierende Fraktion enthielt Membranvesikel, Ribosomen und hochmolekulare Proteinkomplexe sowie Carotinoide (Houghton *et al.*, 1989). Diese Fraktion wurde verworfen. Die darauffolgend eluierende, schwächer absorbierende Fraktion enthielt die Enzyme des C<sub>5</sub>-Weges (Breu und Dörnemann, 1988) und wurde direkt auf ein serielles Affinitätssäulensystem, bestehend aus Blue Sepharose, Matrex Gel Red A und Chlorophyllin-Sepharose gegeben. Die in einem dritten Peak eluierende Fraktion enthielt niedermolekulare Bestandteile des zellfreien Rohhomogenates und wurde ebenfalls verworfen (Breu, 1988). Dieses Säulensystem wurde erstmals von Wang *et al.*, (1981) beschrieben und von Breu und Dörnemann (1988) auf die Trennung der Enzyme des C<sub>5</sub>-Weges aus *Scenedesmus obliquus* übertragen. Im folgenden wird die Elution der einzelnen Affinitätssäulen beschrieben.

### 3.4.2.2 Affinitätschromatographie an Blue Sepharose

Blue Sepharose (Pharmacia, Freiburg) ist eine Affinitätsmatrix, an die vorwiegend Proteine binden, die einen Nukleotid-Cofaktor benötigen. Ursache hierfür ist die Strukturähnlichkeit des an die Gelmatrix gebundenen, blauen Farbstoffes mit dem natürlichen Adenylat-Cofaktor der Enzyme (Easterday und Easterday, 1974). Die hier eingesetzte Säule hatte einen Durchmesser von 3 cm, eine Gelbetthöhe von 25 cm und war, wie auch die nachfolgenden Affinitätssäulen, mit 0,1 M Tricin-Puffer, pH 7,9 äquilibriert. Nicht an die Säule bindende Proteine wurden direkt auf eine nächste Affinitätssäule (Matrex Gel Red A) aufgetragen. Die an die Blue-Sepharose-Säule bindenden Proteine wurden entweder in einem Schritt mit 1 M NaCl in 0,1 M Tricin-Puffer, pH 9, oder mittels eines NaCl-Stufengradienten von der Säule eluiert.

Anschließend wurde die Säule mit 0,5 M NaCl in 0,1 M Natriumacetat (pH 4,5) regeneriert und wieder mit Tricin-Puffer äquilibriert.

### 3.4.2.3 Affinitätschromatographie an Matrex Gel Red A

Die nicht an Blue Sepharose bindende Proteinfraction wurde auf eine Matrex Gel Red A Säule (Biorad, Bad Soden) aufgetragen. Die Säule hatte einen Durchmesser von 2 cm und war 15 cm hoch gefüllt. An dieses Material bindende Proteine wurden mit 1 M NaCl in 0,1 M Tricin-Puffer von der Säule eluiert. Nach jedem Lauf wurde die Säule mit 7 M Harnstoff in 0,5 M NaOH regeneriert.

### 3.4.2.4 Affinitätschromatographie an Chlorophyllin-Sepharose

Chlorophyllin-Sepharose wurde nach dem von Kannangara *et al.*, (1984) beschriebenen Verfahren durch Anbindung von Chlorophyllin an AH-Sepharose hergestellt. Mit dem Material wurde eine Säule von 2 cm Durchmesser und bis zu einer Höhe von 15 cm gefüllt. An Chlorophyllin-Sepharose bindet hauptsächlich die tRNA-Fraktion. Diese wurde mit 1 M NaCl in 0,1 M Tricin-Puffer von der Säule eluiert und das Material dann, wie für die Blue Sepharose beschrieben, regeneriert. Proteine, die an keine der drei Affinitätssäulen banden, wurden als Run of column-Fraktion (Roc) gesammelt.

### 3.4.2.5 Isolierung der tRNA aus dem Chlorophyllin-Sepharose-Eluat



Das NaCl-Eluat der Chlorophyllin-Sepharose enthielt Proteine und tRNAs. Dieses Eluat wurde zuerst mit einer PM-10 Membran (10 kDa Ausschlußgrenze, Filtron, Karlstein) in einem Amiconkonzentrator, wie unter Kap. 3.4.3 beschrieben, auf 20 ml ankonzentriert. Um die störenden Proteinkomponenten aus dem Konzentrat zu entfernen, wurde dieses dreimal mit der gleichen Menge alkalisierten Phenols gemischt und jeweils für 10 min bei Raumtemperatur im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die Phenolphase wurde verworfen. Anschließend wurde dreimal mit Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) ausgeschüttelt, um so Reste von Phenol aus der wäßrigen Phase zu entfernen. Die Lösung wurde mit der 2,5-fachen Menge Ethanol (v/v) und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatpuffer (pH 5,5) versetzt und die tRNA-Fraktion über Nacht bei -20 °C gefällt. Danach wurde die Suspension 40 min bei 5000xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das aus tRNA bestehende Pellet wurde unter Stickstoff getrocknet und in 1 ml sterilen, bidestillierten Wassers aufgenommen.

### 3.4.3 Entsalzen, Umpuffern und Konzentrierung von Proteinlösungen

Das Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen zwischen den verschiedenen Reinigungsschritten erfolgte in fertig gepackten Econo-Pack 10 DG-Säulen mit Sephadex G-50 (Pharmacia, Freiburg) als Säulenmatrix. Die Säulen mit einem Durchmesser von 2 cm und einer Bettlänge von 15 cm, wurde zuerst mit dem für die jeweils weitere Aufarbeitung notwendigen Puffer äquilibriert. Danach wurden maximal 3 ml Proteinlösung aufgetragen und die an die Matrix bindenden Proteine anschließend mit 4 ml Puffer von der Säule eluiert.

Proteinlösungen mit einem Volumen von mehr als 10 ml wurden in Amicon-Zellen von unterschiedlichem Fassungsvermögen mit Flachmembranen einer Ausschlußgrenze von 10 oder 30 kDa (Filtron, Karlstein) bei einem Stickstoffdruck von 2 bis 4 bar eingeeengt. Gebrauchte Flachmembranen wurden durch Abspülen mit 0,1 M NaOH gereinigt und in 70 %-igem EtOH (v/v) aufbewahrt.

### 3.5.1 Isolierung von hochmolekularer, genomischer DNA

Hochmolekulare, genomische DNA aus *Scenedesmus obliquus* wurde nach der Methode von Murray und Thompson (1980) isoliert. Dazu wurden drei Liter heterotroph angezogene Algenkulturen mit einem Gesamt-PCV von ca. 30 ml 10 min bei 3500xg und 4 ° C abzentrifugiert. Die sedimentierten Algen wurden in flüssigem Stickstoff in einer Reibschale zerrieben. Das angetaute Zellhomogenat wurde mit 1 Vol. eines 60 ° C warmen Extraktionspuffers (2 % (w/v) CTAB, 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl) und 200 µl Mercaptoethanol pro ca. 12 ml PCV Algenmaterial versetzt und in einem Wasserbad bei 50 ° C mit einem Glasstab vorsichtig durchmischt. Die weiteren Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Die Suspension wurde 15 min mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) extrahiert und zur Phasentrennung zentrifugiert. Anschließend wurde die wäßrige Phase mit 0,1 Vol. CTAB-Lösung (10 % (w/v) CTAB, 0,7 M NaCl) versetzt und erneut mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) extrahiert. Danach wurde zur wäßrigen Phase 1 Vol. Präzipitationspuffer (1 % (w/v) CTAB, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 1 % (v/v) Mercaptoethanol) hinzugegeben. Durch die resultierende Verminderung der Salzkonzentration bildet sich ein CTAB-Nukleinsäurepräzipitat, das pelletiert und in ca. 5 ml CsCl-Lösung (1 M CsCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA) gelöst wurde. Mit Hilfe einer 6,6 M CsCl-Lösung (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA) wurde die Lösung auf eine Dichte von 1,6 g/ml eingestellt und 0,1 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die Trennung der DNA von der spezifisch schwereren RNA und den spezifisch leichteren Proteinen erfolgte durch Zentrifugation für 44 h bei 300 000xg in einem TFT 75/13 Festwinkelrotor (Kontron, Neufahrn) bei 17 ° C in einer Ultrazentrifuge Centrikon 1080 (Kontron, Neufahrn). Nach Fraktionierung des CsCl-Gradienten wurde die DNA-enhaltende Fraktion fünfmal mit 1 Volumen CsCl-gesättigten Isopropanols zur Entfernung des Ethidiumbromids extrahiert und anschließend 72 h bei 4 ° C gegen 5 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, der 0,25 mM EDTA enthielt, dialysiert. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt (Kap. 3.5.6).

### 3.5.2 Isolierung von Plastiden-DNA aus *Scenedesmus obliquus*

Da aus *Scenedesmus obliquus* keine intakten Plastiden isoliert werden können, die als Ausgangsmaterial für eine Präparation von Plastiden-DNA (ptDNA) eingesetzt werden könnten, erfolgte die Abtrennung der ptDNA durch CsCl-Dichtegradienten- zentrifugation in Gegenwart von Bisbenzimid (‘Hoechst 33258’, Sigma, München) nach Todd *et al.* (1990).

Da das Bisbenzimid bevorzugt an DNA-Sequenzen mit erhöhtem A-T-Gehalt bindet (Manuelidis, 1976), eignet es sich zur Abtrennung der spezifisch leichteren Plastiden-DNA von Mitochondrien- und Kern-DNA. Zur Isolierung von ptDNA wurden jeweils 3 l einer 3 d alten Algensuspension mit ca. 30 ml Gesamt-PCV nach Zentrifugation durch Zerreiben in einer Reibschale in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen, in 100 ml Suspendierungs-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,2 % (w/v) SDS) aufgenommen und bei Raumtemperatur 5 min vorsichtig geschüttelt. Die Suspension wurde 15 min bei 9800xg und 4 ° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 1/8 Volumen 4 M Kaliumacetat-Lösung, pH 6,0, versetzt, 1 h bei 0 ° C inkubiert und anschließend 1 h bei 27000xg und 0 ° C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2 Volumen 96 %-igem (v/v) Ethanol versetzt, die DNA 30 min bei -70 ° C präzipitiert und 30 min bei 27000xg und 0 ° C zentrifugiert. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden in 5 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5), zu dem 50 µl RNase-Lösung (1 mg/ml DNase-freie RNase A, Boehringer, Mannheim) hinzugegeben wurden, resuspendiert und 1 h unter gelegentlichem Umschwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden erneut 2 Volumen 96 %iges Ethanol hinzugegeben und die DNA über Nacht bei -20 ° C präzipitiert. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 22000xg und 4 ° C wurden die DNA-Pellets in je 2 ml TE-Puffer resuspendiert, dann mit 300 µl Proteinase K-Lösung (2 mg/ml) versetzt und 1 h bei 37 ° C inkubiert. Das Volumen der vereinigten DNA-Lösungen wurde dann mit TE-Puffer auf exakt 72 ml

eingestellt. Dazu wurden dann insgesamt 91,63 g CsCl sowie 1 µg Bisbenzimid pro µg DNA zugegeben. Diese Lösung wurde in verschweißbare Zentrifugen-Röhrchen (SCI, Science Services, München) gefüllt und 45 h bei 25 °C und 300000xg in einem Festwinkelrotor TFT 75/13 (Kontron, Neufahrn) zentrifugiert. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fractionen getrennt isoliert, vereinigt und das Bisbenzimid durch Extraktion mit Isopropanol entfernt. Die DNA wurde nach Dialyse in TE-Puffer durch eine Ethanol-fällung ankonzentriert.

### 3.5.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte nach der Methode von Klopstech und Schweiger (1976). Zur Bevorratung wurden Algenzellen nach ihrer Ernte in flüssigem N<sub>2</sub> tiefgefroren und bei -70° C gelagert. Bei Bedarf wurden diese gefrorenen Algenpellets unter flüssigem N<sub>2</sub> zu einem Pulver zerrieben. Das Pulver wurde in 2 Vol. Proteinase-K-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 9,0, 10 mM EDTA, 2 % (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 250 µg/ml Proteinase-K) suspendiert. Anschließend wurde dreimal mit 1 Vol. einer Mischung aus alkalischem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v)) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) extrahiert. Zur Konzentrierung der Nukleinsäuren wurden diese nach Zugabe von 1/10 Vol. 4 M NaCl und 2,5 Vol. 96 %-igem (v/v) Ethanol über Nacht bei -20° C präzipitiert und bei 0 °C 1 h bei 48000xg zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 1-3 ml Wasser resuspendiert. Zur Abtrennung der DNA wurde 1 Vol. 5 M LiCl zugesetzt (Pelham, 1985) und die RNA durch 45 minütige Inkubation bei -20° C gefällt. Die präzipitierte RNA wurde nach Waschen mit 70 %-igem (v/v) Ethanol und anschließendem Trocknen in ca. 100 µl Wasser resuspendiert und bei -70° C gelagert.

### 3.5.4 Anreicherung von Poly(A)-mRNA

Die Anreicherung von Poly(A)-mRNA erfolgte durch Affinitätschromatographie an Oligo(dT)-Zellulose (Aviv und Lederer, 1972). Dazu wurden die präzipitierten Nukleinsäuren (Kap. 3.5.6) in 25 ml Bindungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,5 % (w/v) SDS) bei Raumtemperatur resuspendiert und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert. Anschließend wurde 1 g Oligo(dT)-Zellulose zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Das Säulenmaterial wurde in eine Säule überführt und mit 20 ml Intermediärpuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,1 M NaCl, 0,5 % (w/v) SDS) gewaschen. Gebundene Poly(A)-mRNA wurde durch Zugabe von 15 ml Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5) von der Säule eluiert und in Fraktionen von 1 ml gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden dann, wie unter Kap. 3.2.3 beschrieben, auf ihren RNA-Gehalt untersucht. Die RNA-haltigen Fraktionen wurden durch Ethanol-fällung (Kap. 3.5.6) eingengt. Die verwendete Oligo-dT-Zellulose wurde mit 0,1 M NaOH regeneriert.

### 3.5.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden die Mini- bzw. die Midipräparations-Kits der Firma Promega,

Madison, USA, verwendet. Entsprechend der für das geplante Experiment benötigten Menge an DNA wurden die Präparationen ausgehend von 2 ml (Minipräparation) oder 100 ml (Großpräparation) *E.coli*-Kultur durchgeführt. Für die Anzucht der Zellen wurde jeweils mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und unter Schütteln über Nacht bei 37 ° C inkubiert.

#### Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA

Für diese DNA-Mini- bzw. Midipräparationen wurden Zellen einer über Nacht angezogenen Kultur nach den Angaben des Herstellers (Promega, Madison, USA) lysiert und nach alkalischer Denaturierung an eine Silica-Matrix gebunden. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurde die Waschlösung durch die Matrix gesaugt und anschließend die Plasmid-DNA entsprechend den Herstellerangaben von dem Säulenmaterial eluiert. Die so gewonnene DNA wurde bei 4 °C gelagert.

#### 3.5.6 Ethanolfällung

Die Ankonzentrierung von Nukleinsäuren aus Lösungen erfolgte durch Zugabe von 1/10 Vol. 4 M NaCl-Lösung und Ethanol (2 Vol. bei der DNA- bzw. 2,5 Vol. bei der RNA-Fällung). Die Präzipitation erfolgte über Nacht bei -20 ° C oder für 30 min bei -70 ° C. Anschließend wurde 20 min bei 0 ° C bei 12000xg zentrifugiert, das Nukleinsäurepellet mit 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden an der Luft getrocknet und in sterilem *aq. bidest.* oder TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) aufgenommen.

#### 3.5.7 Phenolextraktion

Proteinverunreinigungen in den DNA-Lösungen wurden durch Extraktion mit einem Gemisch aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol entfernt. Dazu wurden die DNA-Lösungen zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1 (v/v/v)) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) extrahiert. Zur Phasentrennung zwischen den Extraktionsschritten wurde für ca. 2 min zentrifugiert. Die Nukleinsäuren wurden anschließend mit Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt.

#### 3.5.8 Restriktionsverdau

Zur Fragmentanalyse über Agarosegele wurde die präparierte DNA mit Restriktionsendonukleasen des Typs II in dem jeweils auf das eingesetzte Enzym abgestimmten Reaktionspuffern gespalten. Es wurden mindestens 1-3 Units Restriktionsendonuklease pro  $\mu$ g zu spaltender DNA eingesetzt und diese mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert. Zu Spaltungen mit zwei Enzymen an unterschiedlichen Schnittstellen wurde der vom Hersteller für die jeweilige Enzymkombination empfohlene Reaktionspuffer eingesetzt. Die Spaltungsreaktionen wurden durch Zugabe von Probenpuffer für Agarosegele (1 x TBE-Puffer, pH 8,3, 10 % (v/v) Glycerin, 0,004 % (w/v) Bromphenolblau) und anschließende Erhitzen für 10 min bei 65 °C abgestoppt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

### 3.6 Gelelektrophorese und Elution der aufgetrennten Nukleinsäuren

#### 3.6.1 Elektrophorese von DNA über Agarosegele unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten z.B. für Southern Blots, zur Größenbestimmung und zur Kontrolle der Reinheit und Konzentration von DNA-Proben, erfolgte durch Elektrophorese über Agarosegele unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Es wurden analytische Gele einer Größe von 60 mm x 50 mm x 8 mm und präparative Gele der Größe 160 mm x 127 mm x 8 mm verwendet. Die Elektrophorese wurde über horizontale Agarosegele, die je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente 0,8 % bis 1,5 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer (89 mM Tris/HCl, pH 8,3, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) enthielten, durchgeführt. Die Agarose wurde in siedendem Puffer aufgelöst, anschließend in einem Wasserbad auf 60 °C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) aus einer Stammlösung (10 mg/ml) versetzt. Die aufzutragenden DNA-Proben wurden mit Probenpuffer (TBE-Puffer, pH 8,3, 10 % (v/v) Glycerin, 0,004 % (w/v) und Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Die aufgetragene Nukleinsäuremenge betrug bei analytischen Gelen 1-4 µg, bei präparativen Gelen bis zu 25 µg pro Spur.

#### 3.6.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen

Die Auftrennung von RNA für Northern-Blot-Analysen erfolgte mittels Elektrophorese in Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen. Um evtl. vorhandene RNase-Aktivitäten zu beseitigen, wurden die Elektrophoresekammern zuerst mit 0,1 M NaOH und dann zweimal mit autoklaviertem *aq. bidest.* gespült. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelen einer Größe von 160 mm x 127 mm x 8 mm durchgeführt. Zur Herstellung der Gele wurden 1,5 % (w/v) Agarose in siedendem 1 x MOPS-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, mit NaOH auf pH 6,3 eingestellt) aufgelöst, anschließend in einem Wasserbad auf 60 °C abgekühlt und mit Formaldehyd (6 % (v/v) Endkonzentration) in *aq. bidest.* versetzt. Nach dem Aushärten der Gele wurden diese in der Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer (1 x MOPS-Puffer) überschichtet. Die RNA-Proben, vorher auf ein Endvolumen von 7 µl ankonzentriert, wurden mit 3 µl 10 x MOPS-Puffer, 5 µl Formaldehyd-Lösung, 15 µl deionisiertem Formamid und 3 µl Probenpuffer, bestehend aus 60 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau in 1 x MOPS-Puffer, versetzt. Danach wurden die Proben 5 min bei 65 °C inkubiert und nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) zur Elektrophorese eingesetzt.

#### 3.6.3 Elution von Restriktions-Fragmenten mit Hilfe der "Prep-A-Gene"- Methode

Nach der Restriktion (Kap. 3.5.8) und der Auftrennung der Plasmid-DNA in analytischen und präparativen Agarosegelen (Kap. 3.6) wurde die weiter zu untersuchende Bande mit einem abgeflammtten Skalpell auf dem UV-Schirm aus dem Gel ausgeschnitten. Mit Hilfe des "Prep-A-Gene"-Kits wurden, entsprechend den Herstellerangaben (Bio-Rad, Bad Soden), die Gelstücke zuerst in Puffer durch Erwärmen auf 45 °C gelöst und

dann die Restriktionsfragmente im Batch-Verfahren an eine spezifische Gelmatrix gebunden. Anschließend wurde die Gelmatrix mehrmals mit verschiedenen Puffern und anschließender Zentrifugation gewaschen und dann die Fragmente bei 45 °C mit Elutionspuffer entsprechend den Herstellerangaben eluiert.

#### 3.6.4 Elution der Restriktionsfragmente mit Hilfe des Amicon Zentrifugationssystems

Die zu analysierenden DNA Banden wurden, wie unter Kapitel 3.6.3 beschrieben, aus dem Gel ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Banden mit einer Größe von maximal 3 mm wurden mit einem Amicon Zentrifugationssystem (Amicon GmbH, Witten) bestehend aus Gel Nebulizer<sup>TM</sup>, Micropure 0,22, Microcon 30 und einem 1,5 ml Reaktionsgefäß, entsprechend den Herstellervorschriften, behandelt. Mit dem Gel Nebulizer wurde dabei das Gel zerstäubt und im Micropure 0,22 die DNA von der Gelmatrix getrennt. Mittels des Microcons 30 wurden die DNA Fragmente, die eine Basenlänge von 100 bis 1000 bp hatten, aufgefangen und ankonzentriert. Durch umgekehrte Zentrifugation des Microcon 30 wurde die ankonzentrierte DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Bis auf das Microcon 30 wurden alle Teile des Systems vor Gebrauch autoklaviert.

### 3.7 Blotting Methoden

#### 3.7.1 Southern Blot

Nach der Auftrennung der durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen erhaltenen DNA-Fragmente unter nicht denaturierenden Bedingungen in Agarosegelen wurden diese (10-25  $\mu$ g Gesamt-DNA oder 1-5  $\mu$ g Organellen-DNA pro Gelspur) durch Kapillartransfer (Southern, 1975; Sambrook *et al.*, 1989) auf Nylon-Membranen (Hybond-N, Amersham, Braunschweig oder Nylonmembrane, Boehringer, Mannheim) übertragen. Dazu wurde zur Denaturierung der DNA das Agarosegel zunächst zweimal 15 min in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl) und zur anschließenden Neutralisierung dreimal 10 min in Neutralisierungspuffer (5 M Tris/HCl, pH 7, 4,3 M NaCl) gewaschen. Der Transfer der DNA-Fragmente aus dem Gel auf die Nylonmembranen erfolgte in einem Transferstapel. Dieser bestand aus zwei Lagen Whatman 3-MM-Papier, die in das Pufferreservoir eintauchten, drei weiteren Lagen Whatman 3-MM-Papier, gefolgt vom Agarosegel, der Nylonmembran und als oberste Schicht wieder drei Lagen Whatman 3-MM-Papier. Der Flüssigkeitsstrom erfolgte aus einem 20 x SSC-Puffervorrat (1 x SSC: 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0, 150 mM NaCl) in einen Fließpapierstapel, der mit einem Gewicht beschwert wurde. Der Transfer wurde nach 16 h beendet, die Nylonmembranen kurz in 2 x SSC-Puffer gespült, an der Luft getrocknet und zur Fixierung der DNA auf der Membran 4 min mit UV-Licht von 312 nm belichtet. Die Membranen wurden bis zu ihrer Verwendung in Folie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

#### 3.7.2 Northern Blot

Nach der Auftrennung aufgereinigter RNA-Präparationen in Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen wurde die RNA (10-25  $\mu$ g Gesamt-RNA oder 7  $\mu$ g Poly(A)-mRNA pro Gelspur) durch Kapillartransfer auf Nylonmembranen (Kap. 3.7.1) übertragen (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden die Gele nach der Elektrophorese zur Entfernung des Formaldehyds zunächst zweimal für 15 min in 20 x SSC-Puffer (1 x SSC: 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0, 150 mM NaCl) gewaschen und, wie beim Southern-Blot beschrieben, mit einem Flüssigkeitsstrom auf die Membranen transferiert, anschließend fixiert und bei 4 °C gelagert.

#### 3.7.3 Hybridisierung mit nicht-radioaktiv markierten Sonden

Die Hybridisierungen der Southern-Blots mit homologen, DIG-markierten DNA-Sonden wurde bei 68 °C und die der Northern Blots bei 62 °C in Hybridisierungs- röhren von 30 cm Länge und 5 cm Durchmesser in einem Hybridisierungs- ofen (Heraeus, Osterode) durchgeführt. Wurden mehrere Blots zusammen in einer Röhre hybridisiert, so wurden sie durch Nylongewebe voneinander getrennt. Die verwendeten Vorhybridisierungs- und Hybridisierungspuffer hatten beide folgende Zusammensetzung: (1 x SSC: 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0, 150 mM NaCl), 1 % (w/v) Blocking-Reagenz (Boehringer, Mannheim), 0,1 % (w/v) N-Laurylsarkosin und 0,02 % (w/v) SDS. Die Konzentration an markierter DNA im Hybridisierungs- puffer betrug 20 ng/ml. Nach einer Vorhybridisierung von 1-2 h wurde die markierte Sonde nach 10 minütiger



Hitzedenaturierung bei 100 ° C im Wasserbad zugegeben. Danach wurde 12-16 h hybridisiert. Anschließend wurde zweimal 5 min lang mit 2 x SSC-Puffer, der 0,1 % (w/v) SDS enthielt, bei Raumtemperatur und dann zweimal 15 min lang mit 0,5 x SSC-Puffer, der ebenfalls 0,1 % (w/v) SDS enthielt, bei 68 ° C gewaschen. Die Lokalisierung der hybridisierten DNA erfolgte nach ihrer Inkubation mit einem Antikörper durch Chemilumineszenz sowie colorimetrische Detektion. Die Farbreaktion entsteht dadurch, daß der phosphorylierte Antikörper durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert wird. Der entstehende Farbstoff zeigt dann unter UV-Licht eine Chemilumineszenz und kann weiterhin optisch durch das Anfärben lokalisiert werden.

#### 3.7.4 Screening von cDNA-Bibliotheken durch Phagenhybridisierung

Wie in Kap. 3.1.4 beschrieben, wurden die angezogenen Phagenplatten auf 4 °C gekühlt und zur Übertragung der Phagen-DNA anschließend mit markierten und passend geschnittenen Hybond-N-Membran-Filtern (Amersham, Braunschweig) luftblasenfrei belegt. Die Position der Filter wurde auf der Unterseite der Platten markiert. Nach 2 min wurden die Filter vorsichtig wieder abgezogen und für 2 min in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 5 M NaOH) getaucht. Anschließend wurden sie für 5 min in Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH 8) gegeben und dann für weitere 2 min in Äquilibrationpuffer (2 x SSC und 0,1 % (w/v) SDS) getaucht. Zur Fixierung der DNA wurden die Filter anschließend für 4 min auf einen UV-Illuminator gelegt.

Die so erhaltenen Filter wurden, wie unter Kap. 3.7.3 für Southern Blots beschrieben, mit einer DIG-markierten Sonde hybridisiert und gewaschen. Die Detektion erfolgte colorimetrisch.

#### 3.7.5 Chemilumineszenz-Detektion

Zur Detektion der Hybride auf den Membranen wurden folgende Wasch- und Inkubationsschritte nach den Angaben des Herstellers (Boehringer, Mannheim) durchgeführt: Nach 2-minütigem Waschen mit Puffer 1 (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl (pH 7,5), 0,3 % Tween 20) wurde 30 min in DIG-Puffer 2 (DIG- Puffer 1 mit 1 % (w/v) Blocking Reagenz) inkubiert, wobei eine 1:10 000-Verdünnung des Anti-Digoxigenin / Alkalische Phosphatase-Antikörperkonjugates eingesetzt wurde. Anschließend wurde zweimal je 15 min in DIG-Puffer 1 mit 0,3 % Tween 20 gewaschen und dann 2 min mit DIG-Puffer 3 (100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 9,5) inkubiert.

Danach wurde eine 1:100 verdünnte Lösung des Chemilumineszenz-Substrates CDP-Star in DIG-Puffer 3 auf die Membran aufgetragen und diese in Plastikfolie eingeschweißt. Die eingeschweißten Membranen wurden je nach Intensität der Chemiluminizenz 15 min bis 16 h auf einen Röntgenfilm (T-MAT-DG, Kodak) aufgelegt und dieser der Chemilumizenz exponiert.

### 3.7.6 Colorimetrische-Detektion

Bis zu dem Schritt der zweiminütigen Inkubation in DIG-Puffer 3 entsprechen bei der colorimetrischen Detektion alle Operationen zur Detektion des Hybrids denen in Kap. 3.7.5. Nach der Inkubation in DIG-Puffer 3 wurde jedoch dann jeder Filter mit etwa 5 ml Färbelösung übergossen. Die Färbelösung setzte sich wie folgt zusammen : Zu 10 ml DIG-Puffer 3 wurden 45 µl einer Lösung von 75 mg/ml 4-Nitro Blue Tetrazolium Chlorid (NBT) und 70 µl einer Lösung von 25 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-2-Indolyl-Phosphat (BCPIP) gegeben. Der Färbeprozess setzte innerhalb weniger Minuten ein und war nach maximal 16 h abgeschlossen. Die hybridisierenden Plaques auf den Membranen wurden durch ihre violette Färbung sichtbar. Zur dauerhaften Markierung der Lage der Plaques auf der Membran wurden diese mit einem Bleistift gekennzeichnet.

### 3.8 Komplementations-Versuche

#### 3.8.1 Verwendete DNA-Bibliotheken

Für die Komplementationsexperimente wurden rekombinante Plasmide verwendet, die aus unterschiedlichen cDNA-Bibliotheken isoliert wurden. Die cDNA-Bibliotheken waren alle, ausgehend von Zellen des Wildtyp der einzelligen Grünalge *Scenedesmus obliquus*, die unterschiedlich lang belichtet worden waren, erstellt worden. Ausgehend von Poly(A)-mRNA wurden nach Herstellerangaben (Stratagene, La Jolla, USA) cDNA-Banken im Vektorphagen Zap II konstruiert. Es standen für diese Arbeit cDNA-Banken von im Dauerdunkel (DD-Bank), im Dauerlicht (LL-Bank) (Richter, 1994) und unter Blaulicht und Rotlicht (Eisfeld, 1994) angezogenen *Scenedesmus*-Zellen zur Verfügung. Neben diesen cDNA-Banken stand noch eine weitere DNA-Bibliothek, die nicht von cDNA, sondern von plastidärer DNA von *Scenedesmus obliquus* ausgehend, erstellt worden war (Zinn, 1994), zur Verfügung.

#### 3.8.2 *In-vivo*-Excision der cDNA-Bibliotheken

Die *in-vivo*-Excision der cDNA-Bibliotheken erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Stratagene, La Jolla, USA). Eine Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes XL-1-Blue wurde in 5 ml LB-Medium, das zusätzlich 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2 % (w/v) Maltose enthielt, überführt. Das Medium wurde dann über Nacht bei 37 °C in einem Inkubations-schüttler G 25 (New Brunswick, Scientific Inc., New Brunswick USA) inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 10 min bei 1000xg abzentrifugiert, das Pellet in einer 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung aufgenommen und eine optische Dichte der Zellsuspension von etwa 1 eingestellt.

200 µl dieser Zellsuspension wurden mit 10 µl Phagensuspension der jeweils verwendeten cDNA-Bank sowie mit 1 µl Helferphagen R 408 gemischt, 15 min bei 37 °C inkubiert und 50-100 µl dieses Gemisches auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die gewachsenen Zellkolonien mit 3 ml LB/Amp-Medium abgeschwemmt. Die über Nacht angewachsenen Zellkolonien enthielten doppelsträngiges Bluescript-Plasmid und wurden für eine Plasmid-Midi-Präparation verwendet (Kap. 3.5.5).

#### 3.8.3 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Zellen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) von zwei verschiedenen *E. coli*-Stämmen erzeugt, die unterschiedliche Mutationen im *hemA* Gen tragen. Den beiden verwendeten Mutanten GE 1387 und EV 61 ist gemeinsam, daß sie extern zugegebene ALA benötigen, um aerob auf Minimalmedium oder LB Medium wachsen zu können. Der *E.coli*-Stamm GE 1387 besitzt eine Punktmutation und der *E.coli*-Stamm EV 61 eine Deletion auf dem *hemA*-Gen. Zunächst wurde auf M9-Agarplatten oder LB-Agarplatten mit und ohne Zugabe von ALA auf Kolonien dieser Mutation selektioniert.

In der Mutante EV 61 befindet sich im *hemA*-Gen eine zusätzliche Kanamycin- Kassetten, die es ermöglicht, neben der ALA-Abhängigkeit zusätzlich spezifisch auf dieses Gen zu selektionieren (Verkamp, 1989). Dazu befanden sich 20 µg/ml Kanamycin in Medium. Dadurch kann ausgeschlossen werden, daß kompetente Zellen aus einer Kolonie angezogen werden, die durch eine Rückmutation die ALA-Abhängigkeit nicht mehr besitzen. Mit einer solchen, positiv selektionierten Kolonie wurden dann 3 ml Kanamycin-haltiges LB/ALA-Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C in einem Inkubationsschüttler inkubiert. 2 ml dieser Vorkultur wurden mit 125 ml frischem Medium in einen 250 ml Erlenmeyer-Kolben überführt. Nach weiterem, 5-stündigem Wachstum wurden diese Zellen in sterile Zentrifugenbecher überführt, auf Eis 10 min gekühlt und anschließend 10 min bei 4000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem, sterilem *aq. bidest* wurde das Zellpellet in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dieser Behandlung können kompetente Zellen bis zu 6 Monaten bei -70 °C gelagert werden.

### 3.8.4 Transformation einer *hemA*-defizienten Mutante von *E. coli*

Die Technik des Transformierens ist eine molekularbiologische Methode, mit deren Hilfe ein physiologischer Defekt, der auf der Mutation eines spezifischen Gens beruht, komplementiert werden kann. Diese Komplementation erfolgt durch die Transformation von funktionellen Genkopien oder funktionsanalogen Genen, die aus der gleichen oder anderen Spezies gewonnen wurden.

#### Transformation durch Elektroporation

Die Elektroporation von Plasmid-DNA aus ZAP II-cDNA-Banken, welche durch *in-vivo*-Exicision in XL-1-Blue *E. coli* Zellen (Kap. 3.8.2) transformiert worden waren, erfolgte nach einer Methode, die Dower *et al.*, (1988) für die Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen entwickelt haben. Beim Elektroporationsverfahren werden die Zellmembranen der in Suspension befindlichen *E. coli*-Zellen durch kurze elektrische Pulse einer hohen Feldstärke von ca. 2,5 kV/cm für DNA-Moleküle durchlässig gemacht. Es wurden 40 µl der, wie in Kapitel 3.8.3 beschrieben, kompetent gemachten Zellen auf Eis mit 1 µl einer Plasmidpräparation gemischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten gefüllt. Diese Küvetten wurden in eine Elektroporations- anlage des Typs Gene Pulse™ (Biorad, Bad Soden) gestellt und die Zellen 3 s einer Spannung von 2,5 kV ausgesetzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert, damit sich die Zellen regenerieren konnten. Dadurch erhalten die Zellen die mit dem Plasmid übertragene Ampicillinresistenz. Die Zellen wurden dann, je nach Mutante, auf LB/Ampicillin- oder LB/Kanamycin-Agarplatten zur Selektion ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.9 PCR-Techniken

#### 3.9.1 Synthese einzelsträngiger cDNA als Matrize für PCR-Reaktionen

Die Synthese einzelsträngiger cDNA, die in Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) als Matrize (Template) eingesetzt werden sollte, erfolgte ausgehend von Poly(A)-mRNA, (Kap. 3.5.4) nach Harvey und Darlison (1991). Der Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl wurde, wie folgt, angesetzt: 2 µg mRNA wurden in 25 µl *aq. bidest* bei 65 °C für 10 min denaturiert und mit 1 µl 1 M DTT-Lösung, 10 µl dNTP-Mix (dNTP-Konzentration: je 5 mM im Mix), 2 µl Hexanukleotid-Primer-Gemisch (500 pmol), 1 µl RNase-Inhibitor (40 U RNasin, Promega, Heidelberg), 4 µl 5 x Reverse Transkriptase Reaktionspuffer (500 mM Tris/HCl, pH 8, 600 mM KCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>) und 5 µl Reverse Transkriptase (USB, Boston, USA) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die cDNA mit Isopropanol präzipitiert und nach Zentrifugation und Waschen mit 70 %-igem (v/v) Ethanol in 100 µl *aq. bidest.* gelöst. Die gewonnene, einzelsträngige cDNA wurde vor ihrem Einsatz als Template für die PCR-Experimente 5 min zur Denaturierung auf 95 °C erhitzt und dann sofort auf Eis abgekühlt.

#### 3.9.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird enzymatisch ein DNA-Segment *in vitro* amplifiziert. Dafür werden drei verschiedenen Nukleinsäuresegmente benötigt:

- 1.) Template: einzelsträngige DNA als Matrize
- 2.) "Up-Stream"-Primer: einzelsträngige Oligonukleotide
- 3.) "Down-Stream"-Primer: einzelsträngige Oligonukleotide

Die beiden Primer sollten ihrer Länge nach an die Template-DNA hybridisieren. Mit Hilfe der DNA-Polymerase werden die zugegebenen Desoxyribonukleotide (dNTP's) an das zwischen den Primern liegende DNA-Segment angelagert und vom 3' Ende her in 5'-Richtung miteinander verknüpft. Jeder Amplifikationszyklus besteht aus Denaturierung, Anbindung (Annealing) der Primer und Synthese. Im vorliegenden Fall wurden bei der PCR 35 Zyklen durchgeführt. Dabei verdoppelt sich theoretisch bei jedem Zyklus die Menge des DNA-Segmentes.

## PCR-Amplifikationsexperimente

Bei den für diese Arbeit durchgeführten Amplifikationsexperimenten wurde einzelsträngige cDNA, die wie in Kap.3.9 beschrieben, synthetisiert wurde, als Matrize eingesetzt. Den Reaktionsansätzen wurde zu Beginn der PCR-Experimente Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt. Ein Zusatz von DMSO unterbindet die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Template-DNA und erleichtert damit besonders die Amplifikation von GC-reicher Template-DNA (Hung *et al.*, 1990). Spätere PCR-Experimente zeigten allerdings, daß die Verwendung von DMSO bei der hier verwendeten Template-DNA nicht nötig war. Die Reaktionsansätze mit einem Endvolumen von 50 µl hatten die folgende Zusammensetzung: 50 bis 100 ng Template-DNA, je 50-100 pmol des "Up-Stream" und "Down-Stream" Primers, 100 µ M dNTP-Mix, 5 µ l 10 x Reaktionspuffer (100 mM Tris/Cl, pH 8,3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 1 mg/ml Gelatine), 2,5 % (v/v) DMSO und 2 U TAQ-Polymerase (Boehringer, Mannheim), auf 50 µl mit *aq. bideest* aufgefüllt. Zur Durchführung der PCR-Reaktionen wurden die Reaktionsgemische in 0,5 ml Reaktionsgefäßen vor Beginn der Reaktionszyklen mit Mineralöl überschichtet, um die Verdunstung zu minimieren. Alle Reaktionen wurden in einem programmierbaren Thermoblock (Mini Cyclor, MJ Research, USA) durchgeführt. Um ein vollständiges Denaturieren der Template-DNA zu gewährleisten, wurden die Reaktionsansätze zunächst 5 min auf 94 ° C erhitzt. Anschließend wurden 35 identische Reaktionszyklen nach folgendem Temperaturprofil durchlaufen :

a) Denaturierung : 1 min bei 94 ° C,

b) Annealing

: 2 min bei 55 ° C,

c) Elongation

: 2 min bei 72 ° C

Zur Analyse der Reaktionsprodukte wurde zunächst der Reaktionsansatz zur Entfernung des Mineralöls mit Chloroform extrahiert und dann, wie in Kap. 3.6.1.beschrieben, über ein Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

## PCR-Reamplifikationsexperimente

Die durch PCR-Amplifikation gewonnene DNA wurde über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA-Bande der zu erwartenden Größe aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (Kap. 3.6.3). Die so gewonnene DNA diente als Template und wurde durch PCR-Reamplifikations-Experimenten weiter vermehrt. Die Versuchsbedingungen entsprachen dabei den unter "PCR-Amplifikationsexperimente" aufgeführten.

## Markierung von PCR-Produkten

Die Markierung von PCR-Produkten erfolgte durch Inkorporation von Digoxigenin-11-dUTP-(DIG-UTP)-markierten Nukleotiden wie bei der PCR-Reaktion des DIG-Systems entsprechend den Herstellerangaben (Boehringer Mannheim). Für dieses Experiment wurde die PCR, wie in Kap. 3.9.2 beschrieben, durchgeführt. Anstelle des unmarkierten, 100  $\mu$  M dNTP-Mix wurde jedoch ein mit DIG-UTP markierter dNTP-Mix gleicher Konzentration eingesetzt. Die Überprüfung des erfolgreich markierten PCR-Produktes erfolgte nach Angaben des Herstellers, indem Verdünnungen von 1 ng, 100 pg, 10 pg, und 1 pg der markierten DNA als Probe eingesetzt wurden.

### 3.9.3 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung der durch PCR (Kap. 3.9.2) gewonnenen DNA-Fragmente wurden diese mit Hilfe des pMOSBlue T-Vektor Kits (Amersham, Deutschland) in einen pMOS Vektor nach Herstellerangaben einligiert. Hierbei wird ausgenutzt, daß die für die PCR eingesetzten Polymerasen unabhängig vom Template ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende anfügen (Clark, 1988). Das PCR-Produkt wird komplementär zu einem Deoxythymidin eingebaut. Die rekombinante Vektor-DNA wurde dann durch Transformation in *E. coli*-Zellen eingeschleust. Das Wachstum der Kolonien mit Vektor-DNA unter Selektionsbedingungen wurde auf Agarplatten mit Ampicillin und Tetracyclin durchgeführt. Die Platten wurden zusätzlich mit IPTG und X-Gal behandelt. Zellen mit Vektoren, aber ohne Insert, erscheinen auf diesen Platten blau, solche mit rekombinanter Vektor-DNA weiß, da auf dem Vektor zusätzlich Genabschnitte für das  $\beta$ -Galaktose-Gen eingebaut sind, die durch die Einklonierung eines Genfragmentes unterbrochen werden. Der Reaktionsansatz für die Ligation setzte sich wie folgt zusammen: 1  $\mu$ l 10x Ligationspuffer (aus dem Kit), 0,5  $\mu$ l 100 mM DTT, 0,5  $\mu$ l 10 mM ATP, 1  $\mu$ l Vektor (50 ng/ $\mu$ l) und 0,5  $\mu$ l T4 DNA-Ligase (4 U/ $\mu$ l). Es wurde soviel von dem PCR-Produkt zugegeben, daß das Verhältnis von Vektor zu dem einzuliegenden Insert in einem molaren Verhältnis von 1:5 bis 1:10 lag. Die Inkubation wurde über Nacht bei 16 °C durchgeführt. Für die Transformation wurden je 20  $\mu$ l kompetente Zellen aus dem Kit in vorgekühlte Reaktionsgefäße gegeben. Anschließend wurde 1  $\mu$ l des Ligationsansatzes zugesetzt, gemischt und für 30 min in Eis gekühlt. Das Gemisch wurde für 40 s auf 42 °C erwärmt und erneut 2 min auf Eis gestellt. Dann wurden 80  $\mu$ l SOC-Medium aus dem Kit zugegeben und für 1 h bei 37 °C und 250 rpm auf einem Schüttelinkubator Typ G25 (New Brunswick Scientific Inc., USA) inkubiert. Die so transformierten Zellen wurden, wie Kap. 3.1.3 beschrieben, angezogen, und die Plasmide, wie in Kap. 3.5.5. aufgeführt, isoliert.

### 3.10 DNA-Sequenzierung

Die, wie in Kap. 3.5.5. beschrieben, gereinigte, doppelsträngige Plasmid-DNA wurde zunächst alkalisch denaturiert. Dazu wurden 5 µg DNA durch Zugabe von je 0,1 Volumen 2 M NaOH und 2 mM EDTA 30 min lang bei 37° C inkubiert und die Probe dann durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat neutralisiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens 96%-igen Ethanol 20 min bei -70 °C präzipitiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 12000xg und 0 ° C, sowie anschließendem Waschen des Niederschlags mit 70 %-igem (v/v) Ethanol, wurde das Pellet getrocknet, in 7 µl *aq. bidest.* resuspendiert und anschließend zur Sequenzierung mit Sequenase 2.0 eingesetzt.

#### 3.10.1 Radioaktive Sequenzierungsreaktion mit Sequenase 2.0

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Kettenabbruch-methode (Sanger *et. al.*, 1977) mit Hilfe von 2,3-Didesoxynukleotiden (ddNTP s), <sup>35</sup> S-dATP zur radioaktiven Markierung und Sequenase 2.0, einer modifizierten DNA-Polymerase des Bacteriophagen T7. Für die Sequenzierung wurde ein DNA- Sequencing Kit der Firma USB, (Bad Homburg), verwendet. Als Primer wurden der (-40)-Primer und der SK-Primer eingesetzt.

#### Anlagerung der Primer an die Plasmid DNA

Der erste Reaktionsschritt der Sequenzierung ist die Anlagerung der Primer an die DNA. Der Reaktionsansatz enthielt 7 µl denaturierter DNA, 2 µl 5-fach konzentrierten Reaktionspuffers (0,2 M Tris/HCl, pH 7,5, 0,1 M MgCl, 0,25 M NaCl) und 1 µl Primer (1 pmol). Zur Anlagerung der Primer an die DNA wurde der Reaktionsansatz 2 min in einem Thermoblock auf 65 °C erhitzt und dann innerhalb von 30 min auf 45 °C abgekühlt.

#### Markierung der DNA mit <sup>35</sup>S-dATP

Zur Fortsetzung der Sequenzierung wurden die Reaktionsansätze aus 10 µl DNA/Primer-Mischung, 1 µl 0,1 M DTT, je 2 µl 1,5 µM dGTP-, dCTP- und dTTP-Lösung, 0,5 µl <sup>35</sup>S-dATP (1µCi) und 1 µl Sequenase 2.0 durch kurze Zentrifugation gemischt und anschließend zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.



### Kettenabbruch durch Zugabe von ddNTP s

Abschließend wurden zum Kettenabbruch je 2,5 µl eines ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP-Terminations-Mixes in vier Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt (je ein Eppendorfgefäß pro ddNTP-Mix) und auf 37 °C temperiert. Die Terminationsgemische enthielten je 80 µM dGTP, dATP, dCTP, 50 mM NaCl und 8 µM des jeweiligen ddNTP (ddGTP, ddATP, ddCTP oder ddTTP). Jeweils 3,5 µl des Markierungsansatzes wurden zu je einem der ddNukleotid-Terminationsmixe zugegeben und 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Stoppuffer (95 % (v/v) Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylene Cyanol) beendet.

### 3.10.2 Auftrennung der sequenzierten DNA-Proben durch Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der sequenzierten DNA-Proben wurde das DNA-Sequenzier-Gelsystem der Firma Biorad sowie eine Hochspannungsquelle (Power Pack P30, Biometra, Göttingen) verwendet. Um nach der Auftrennung das Gel von der Laminarstromplatte lösen zu können, wurde diese vor dem Gießen des Geles mit Aceton und Ethanol gereinigt und anschließend die Laminarstromplatte mit Trennsilan und die Gegenplatte mit Bindesilan behandelt. Dann wurden die Platten noch einmal mit Ethanol poliert. Das Trennsilan besteht aus 4 % (v/v) Dichlormethylsilan und 96 % (v/v) Chloroform, das Bindesilan aus 38 µl 3-Methacryloxypropyl-trimethylsilan, 375 µl 10 %-iger (v/v) Essigsäure und 12,5 µl Ethanol. Die Reagenzien wurden mit *aq. bidest* auf ein Volumen von 15 ml aufgefüllt. Das Gel wurde in horizontaler Stellung auf einem Nivelliertisch gegossen.

Die wäßrige Lösung für ein 6 %iges Sequenziergel enthielt 45 g Harnstoff, 15 ml Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 30:0,8, 5 ml 10xTBE-Puffer, 1 ml 10 %-ige (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 30-50 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) pro 100 ml. Diese Lösung wurde sterilfiltriert und entgast. Nach Zugabe von APS und TEMED wurde die Lösung zwischen die waagrecht liegenden Gelplatten gegossen, wobei die Lösung durch Kapillarkräfte zwischen die Platten gesaugt und verteilt wird. Es wurde darauf geachtet, daß keine Gasblasen eingeschlossen wurden. Das Gel wurde über Nacht auspolymerisiert, dann an die Sequenzierapparatur angeschlossen und die Laminarstromplatte langsam auf 56 °C temperiert. Als Elektrophoresepuffer wurde 1xTBE-Puffer verwendet. Das Gel wurde eine halbe Stunde bei 1500 V äquilibriert. Die zu sequenzierenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel 2 min bei 80 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte dann bei 1700-2000 V über einen Zeitraum von 4 bis 12 Stunden. Das Sequenzier-Gel wurde zur Entfernung des Harnstoffes 30 min in 10 %-iger (v/v) Essigsäure gelegt und danach zwei Stunden bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurde das Gel autoradiographisch ausgewertet.

### 3.10.3 Automatische DNA-Sequenzierung

Für die automatische Sequenzierung wurden 3 bis 5 µg Plasmid-DNA, wie in Kapitel 3.10 beschrieben, alkalisch denaturiert und auf eine Konzentration von 0,2-0,3 µg/µl eingestellt. Die verwendeten Primer hatten eine Konzentration von 5 pmol/µl. Die automatische Sequenzierung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Müller, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Werner, mit einem automatischen Sequenzer (LI-COR dna sequenzer modell 4000, MWG-Biotech, Ebersberg ) durchgeführt.

Ferner wurden DNA-Proben an die Firma Medigene (Martinsried, München) zum automatisch Sequenzieren in Auftrag gegeben.

#### 3.10.4 DNA- und Protein-Sequenzauswertung

Eine computergestützte Auswertung der erhaltenen DNA-Sequenzen und der abgeleiteten Proteinsequenzen, sowie der Vergleich mit bereits bekannten Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe des "BLAST Network Service" (blast@ncbi.nlm.nih.gov) am "National Center for Biotechnology Information" USA (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990), sowie mit dem Programm DNASIS 1.10 der Firma Hitachi Software Engineering America, Ltd., (San Bruno, California, USA). Bei der Auswertung wurden alle sechs theoretisch vorstellbaren Leserahmen der DNA-Sequenzen überprüft.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Biochemische Untersuchungen zur Glutamyl-tRNA-Reduktase aus *Scenedesmus obliquus*

Die Bildung von 5-Aminolävulinsäure (ALA) erfolgt bei Höheren Pflanzen und Grünalgen über den C<sub>5</sub>-Weg (zur Übersicht siehe Dörnemann, 1992; Avissar und Moberg 1995). Am Ablauf des C<sub>5</sub>-Weges sind mehrere katalytische Komponenten beteiligt. Im ersten Schritt findet die Beladung einer tRNA<sup>Glu</sup> mit Glutamat durch eine Glutamyl-tRNA-Synthetase statt. Im zweiten Schritt erfolgt die Reduktion des so aktivierten Glutamats durch eine NADPH-abhängige Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR) zu Glutamat-1-Semialdehyd, wobei eine intakte tRNA<sup>Glu</sup> freigesetzt wird. Diese Reaktion zeichnet sich durch die hohe Spezifität der GluTR für die umzusetzende Glutamyl-tRNA aus (Avissar und Moberg, 1995). Über den Mechanismus der Reduktion ist bisher wenig bekannt (Kannangara *et al.*, 1994). Der gebildete Semialdehyd wird durch die Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSA-AM) schließlich in ALA umgewandelt.

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die GluTR aus *Scenedesmus obliquus* zu isolieren und ihre Charakterisierung anzugehen.

#### 4.1.1 Versuche zur Reinigung der Glutamyl-tRNA-Reduktase aus *Scenedesmus obliquus*

Zur raschen Einarbeitung in die Methode zur Messung der GluTR wurde in einem dreiwöchigen Aufenthalt am Carlsberg Laboratorium in Kopenhagen bei Herrn Dr. C.G. Kannangara die Messung dieser Enzymaktivität aus *Hordeum vulgare* erlernt. Nachdem in unserem Labor die Messung der GluTR aus *Hordeum vulgare* nachvollzogen werden konnte, wurde versucht, den Aktivitätstest auf die GluTR aus *Scenedesmus obliquus* zu übertragen, wobei auch hier die Methode von Pontoppidan und Kannangara (1994) angewandt wurde. Bei diesem Test handelt es sich um einen gekoppelten Enzymtest, bei dem Blue Sepharose-Präparationen, die die Nukleotid-Cofaktor abhängigen Enzyme Glutamyl-tRNA-Synthetase- und Glutamyl-tRNA-Reduktase enthalten, mit dem Durchlauf (Run-off-Columm), des Affinitätssäulensystem, der das Enzym Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase enthält, kombiniert werden (Kap.3.3.3). Des weiteren wurden tRNA-Präparationen aus dem Eluat der Chlorophyllin-Sepharose-Säule hinzugefügt, um die Umsetzung von radioaktiv markiertem [1-<sup>14</sup>C]-Glutamat zu ALA zu ermöglichen. Hierbei wird das radioaktive C-1-Atom des Glutamats zum C-5 der 5-Aminolävulinsäure (Beale und Castelfranco 1974; Beale *et al.*, 1975; Klein und Senger, 1978).

Die gebildete ALA wurde anhand ihrer Retentionszeit bei der HPLC-Auftrennung des Reaktionsgemisches identifiziert. Als Referenz wurden die Retentionszeiten von käuflichem, radioaktiv markiertem Glutamat und ebensolcher 5-Aminolävulinsäure ermittelt.

In Abbildung 6 sind die HPLC-Elutionsdiagramme der radioaktiv markierten Standards, Glutamat und Aminolävulinsäure, dargestellt. [1-<sup>14</sup>C]-Glutamat eluiert danach bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml / min bei ca. 3 min und [1-<sup>14</sup>C]- 5-Aminolävulinsäure bei etwa 15 min von der Säule.

Insgesamt wurden 30 zellfreie Rohomogenate aus ca. 150 l Algensuspension, wie in Kapitel 3.4.1

beschrieben, erstellt und versucht daraus die GluTR anzureichern und ihre Aktivität zu bestimmen. Im Rahmen der Aktivitätsbestimmungen wurden verschiedene Parameter bei der Aufarbeitung der Zellen und im Enzymtest geändert. So wurde der pH-Wert des Reaktionsgemisches zwischen pH 6 bis 9 variiert. Weiterhin wurde die Temperatur, die Inkubationsdauer, die NADPH- und die ATP-Konzentration im Enzymtest geändert, wobei NADPH Konzentrationen zwischen 0,5 und 3 mM, und ATP-Konzentrationen zwischen 0,5 und 5 mM eingesetzt wurden. Temperatur und Reaktionsdauer wurden ebenfalls verändert. So wurde die Temperatur in 5 °C-Schritten von 20 bis 35 °C und die Reaktionsdauer in 10 min Schritten von 20 bis 60 min variiert. Abbildung 7 zeigt ein Elutionsdiagramm, bei dem der Enzymtest bei pH 8 durchgeführt wurde, dem pH-Wert, bei dem alle anderen Enzyme des C<sub>5</sub>-Weges ihr Optimum aufweisen. Da die Ergebnisse auch bei allen anderen Variationen des Enzymtests negativ waren, wird auf deren Darstellung verzichtet und nur dieses eine Elutionsdiagramm beispielhaft wiedergegeben. Das abgebildete Elutionsdiagramm zeigt als einzigen Peak den des eingesetzten, radioaktiv markierten [1-<sup>14</sup>C]-Glutamats, jedoch keine Radioaktivität bei der erwarteten Retentionszeit von ALA von ca. 15 bis 20 min.

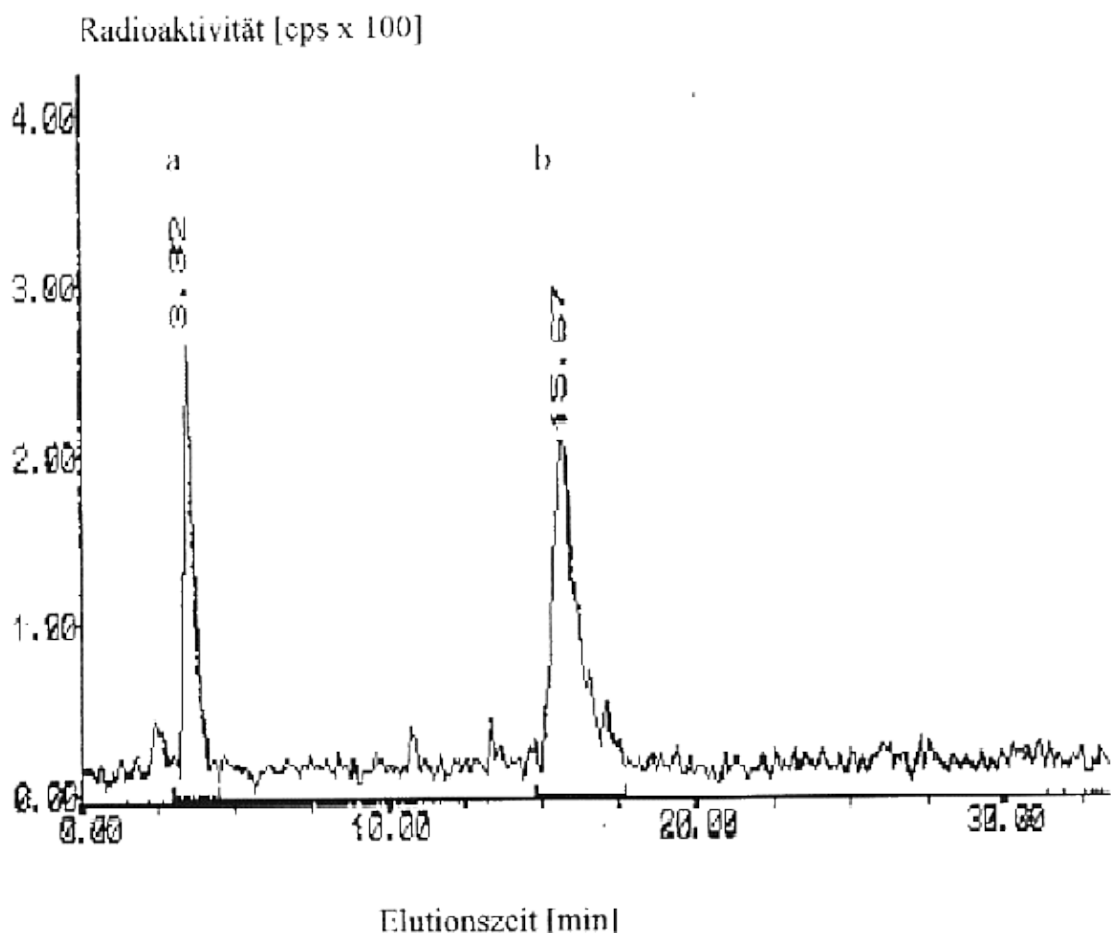


Abb. 6 :

HPLC-Elutionsdiagramm der radioaktiv markierten Standards; a : [1-<sup>14</sup>C]- Glutamat; b : [5-<sup>14</sup>C]-5-Aminolävulinsäure

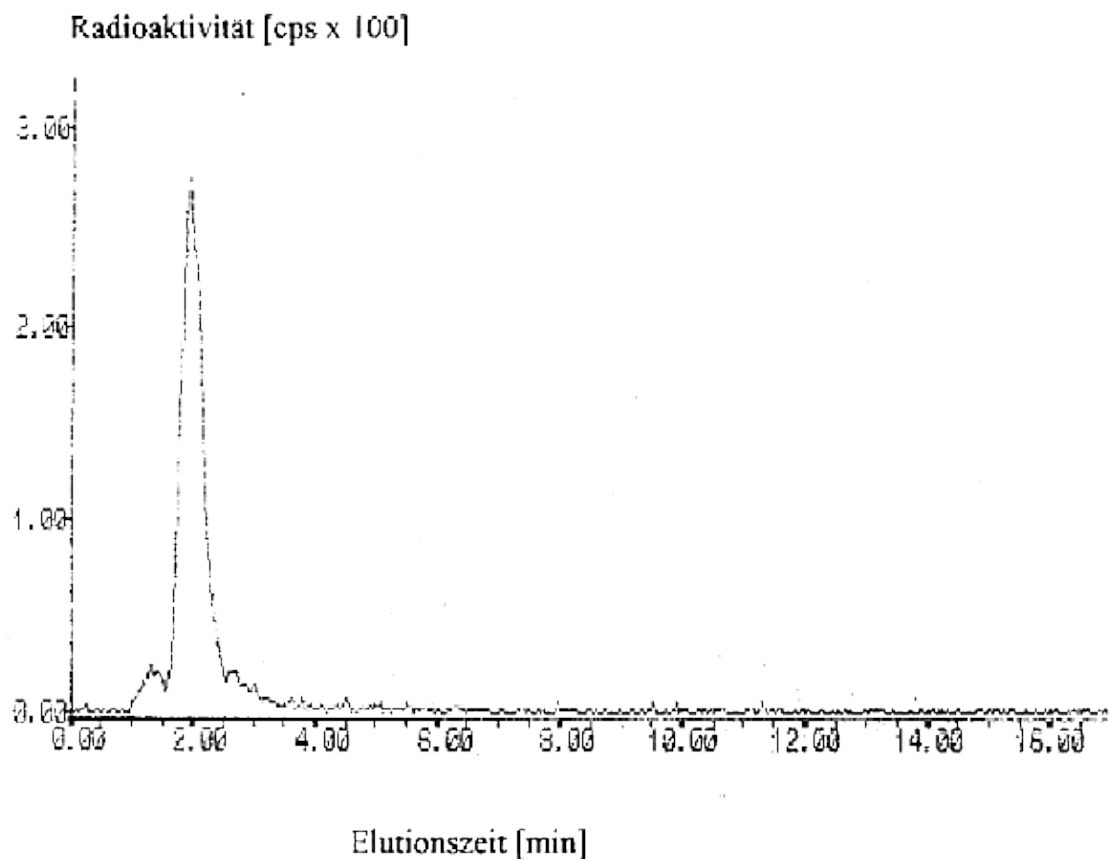


Abb. 7:

Beispielhaftes Elutionsdiagramm eines Reaktionsgemisches, bei dem der GluTR-Enzymtest bei pH 8 durchgeführt wurde.

## 4.2 Diskussion zu Kapitel 4.1

Von allen Enzymen und katalytischen Komponenten des C<sub>5</sub>-Weges ist die Glutamyl-tRNA-Reduktase bisher am wenigsten untersucht. Bis heute konnten nur 5 Glutamyl-tRNA-Reduktasen als aktive Enzymproteine gereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Tabelle 2 gibt eine Auflistung der Organismen, der molekularen Massen und des Untereinheiten-Aufbaus der bisher gereinigten GluTR, und die Autoren wieder.

Organismus	molekulare Masse	Autoren
Synechocystis sp. PCC 6803	350 kDa-Multimer, bestehend aus 9 (?) 39 kDa-Untereinheiten	Rieble u. Beale, 1991
Hordeum vulgare	270 kDa-Multimer bestehend aus 5 identischen 54 kDa- Untereinheiten	Pontoppidan u. Kannangara, 1994
Chlamydomonas reinhardtii	130 kDa-Monomer	Chen <i>et al.</i> , 1991
Escherichia coli	Zwei Glutamyl-tRNA-Reduktasen  1.) 85 kDa-Monomer  2.) 45 kDa-Monomer	Jahn <i>et al.</i> , 1991
Bacillus subtilis	46 kDa-Monomer	Verkamp <i>et al.</i> , 1992

Tab. 2 :

Auflistung bisher bis zur apparenten Homogenität gereinigter Glutamyl- tRNA-Reduktasen, ihre molekularen Massen und ihr Aufbau aus Unter- einheiten.

Aus den Daten, die von den Reinigungen verschiedener GluTR bisher zur Verfügung stehen, lassen sich nur wenige Rückschlüsse über Aufbau und Funktionsweise des Enzyms ziehen. Die GluTR ist bei Grünalgen und Höheren Pflanzen im Chloroplasten lokalisiert. Um bei der Aufreinigung des Enzyms eine möglichst geringe Kontamination mit extraplastidären Proteinen zu erzielen, wird bei Pflanzen immer von einer Plastidenpräparation ausgegangen. Da die GluTR nur in sehr geringen Mengen in den Plastiden vorhanden und außerdem sehr instabil ist, wurde bei der Reinigung der GluTR aus *Hordeum vulgare* von 25 kg Saatgut ausgegangen, um ausreichend Pflanzenmaterial für eine Plastidenpräparation und die anschließende Enzymreinigung zur Verfügung zu haben (Pontoppidan und Kannangara, 1994). Für die Reinigung der beiden GluTR aus *E. coli* wurde von 200 l Zellkultur mit einem Feuchtzellgewicht von 650 g ausgegangen (Jahn, 1992). Für die Reinigung der Glutamyl-tRNA-Reduktase aus *Clamydomonas reinhardtii* wurde eine zellwandlose Mutante verwendet (Chen *et al.* 1990), was erst die Isolierung von Chloroplasten ermöglichte. Hier wurde von 450 l Algensuspension ausgegangen. Da für die Grünalge *Scenedesmus obliquus* keine zellwandlose Mutante zur Verfügung steht, und es, wie bei fast allen Grünalgen, nicht möglich ist, intakte Plastiden zu isolieren, mußte hier von der gesamten, löslichen Proteinfraction ausgegangen werden, was die Reinigung der GluTR zusätzlich erschwerte. Zum Aufbruch der sehr stabilen Zellwand, die zum großen Teil aus Sporopollenin

besteht, muß *Scenedesmus* mit einer Vibrogen-Zellmühle aufgebrochen werden. Dieser Aufarbeitungsschritt ist einer der limitierenden Faktoren bei der Reinigung der GluTR aus diesem Organismus. Pro Aufbruch kann in der dazu notwendigen Zellmühle maximal ein Zellkonzentrat aus 8 l Algensuspension bearbeitet werden, wozu eine Zeit von ca. 10 min benötigt wird. Wegen der mutmaßlich ebenfalls sehr geringen Konzentration der GluTR in den *Scenedesmus*-Zellen müßte folglich ein Vielfaches dieser Menge aufgebrochen werden.

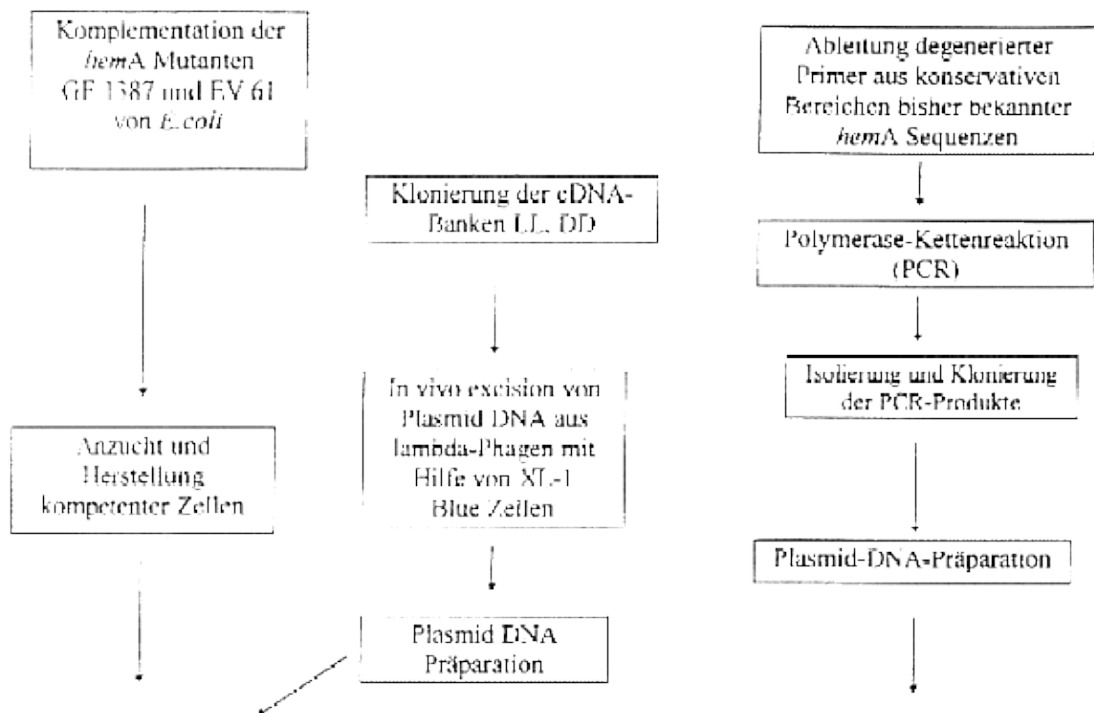
In Analogie zu den oben geschilderten Ansätzen müßte man bei der Grünalge *Scenedesmus obliquus* von ca. 500 l Algensuspension ausgehen, was eine Gesamtaufbruchszeit von ca. 10 Stunden bedeuten würde. Dieser Zeitaufwand bedeutet aber angesichts der hohen Labilität der GluTR, daß während des Zellaufbruchs ein großer Teil der GluTR-Aktivität zerstört würde (Kannangara *et al.*, 1994). Somit stellt die Menge des benötigten Materials, und daraus resultierend, die Dauer des Aufbruchs einen absolut limitierenden Faktor bei der Aufreinigung der GluTR aus *Scenedesmus obliquus* dar. Auch wäre die Herstellung des 300000xg-Überstandes aus dem aufgebrochenen Zellmaterial mit der Ultrazentrifuge, der vor dem Auftragen auf das Säulensystem erstellt werden muß, aus Kapazitätsgründen nahezu unmöglich.

Selbst wenn man eine derartig große Aufarbeitung durchführen könnte, wäre das serielle Säulenchromatographiesystem mit Blue Sepharose, Matrex Gel Red A und Chlorophyllin Sepharose aus Kostengründen nicht realisierbar. Das Säulensystem müßte in einem großen Maßstab mehrfach vorhanden sein, um das Enzym zügig aus den löslichen Proteinfractionen isolieren zu können. Dies war aber, wie erwähnt, aus Kostengründen nicht realisierbar und vertretbar, da auch bei Einsatz derartig großer Materialmengen ein Erfolg nicht garantiert schien. Folglich wurde auf die Reinigung der GluTR aus *Scenedesmus obliquus* verzichtet und eine andere Strategie zu ihrer Charakterisierung eingeschlagen.

#### 4.3 Strategien zur Klonierung der Glutaryl-tRNA-Reduktase

Aufgrund der Tatsache, daß es nicht gelungen war, die GluTR aus *Scenedesmus obliquus* zu reinigen und ihre Aktivität zu messen, wurden Strategien entwickelt, um das *hemA*-Gen, das für die Glutaryl-tRNA-Reduktase aus *Scenedesmus obliquus* kodiert, zu klonieren.

Abbildung 8 zeigt als Flußdiagramm die angewendeten Strategien und die Abfolge der molekularbiologischen Experimente, mit deren Hilfe versucht wurde, das *hemA*-Gen aus *Scenedesmus obliquus* zu isolieren.





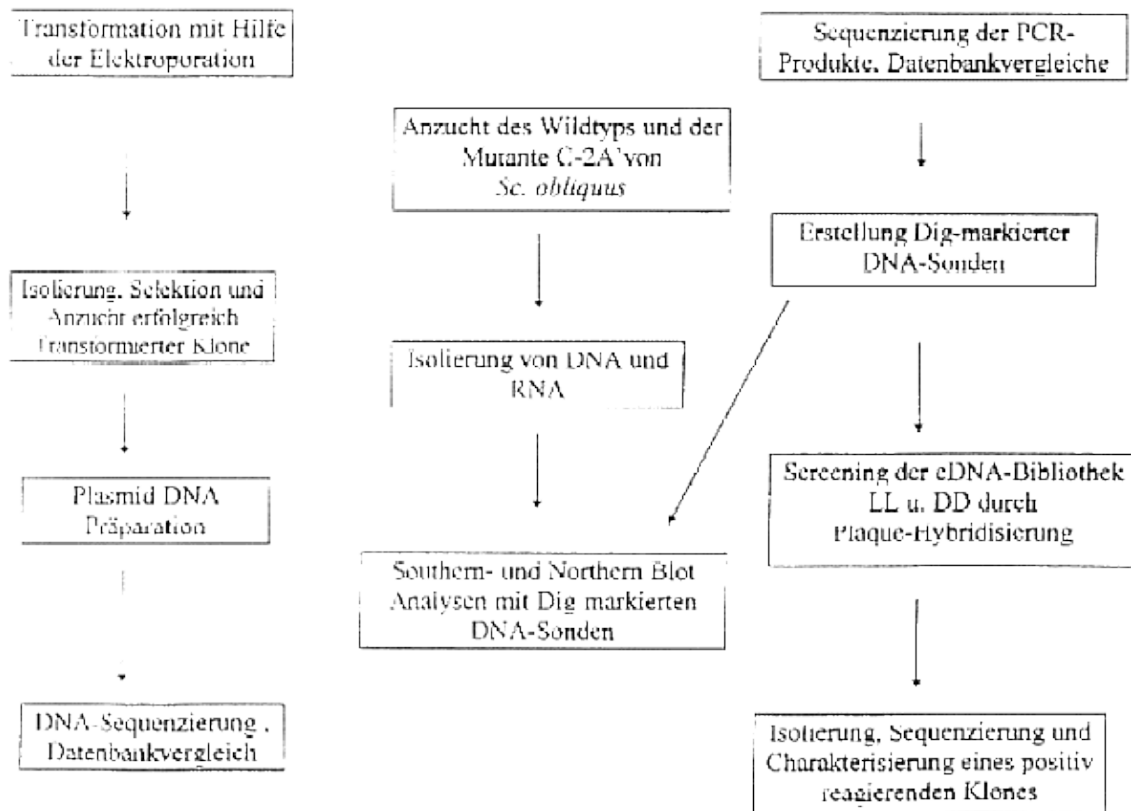


Abb. 8 :

Flußdiagramm der durchgeführten Experimente zur Klonierung der GluTR. Die Abkürzungen aus diesem Flußdiagramm sind im Abkürzungsverzeichniss am Anfang der Arbeit aufgeführt.

Im folgenden wird die Durchführung der verschiedenen Strategien und deren Ergebnisse dargestellt.

#### 4.4 Komplementation von *hemA*-Gen defizienten Mutanten von *E.coli*

Durch die Technik der Komplementation kann ein physiologischer Defekt, der auf einer Mutation, das heißt, auf der Ausschaltung eines spezifischen Gens beruht, behoben werden. Hierzu wird durch Transformation das mutierte Gen durch eine Genkopie aus einem anderen Organismus ersetzt. Man kann bei diesem Verfahren zum Teil auch funktionsanaloge Gene aus anderen Spezies benutzen, um das mutierte Gen zu komplementieren.

##### 4.4.1 Transformation durch Elektroporation

Aus den cDNA-Banken LL (Dauerlicht) und DD (Dauerdunkel) (Richter, 1994) von *Scenedesmus obliquus* wurde rekombinante Plasmid-DNA isoliert und durch Elektroporation in kompetente Zellen der *hemA*-Gen defizienten *E. coli*-Mutanten EV 61 und GE 1387 transformiert (Kap. 3.8.4). Die Transformationen wurden mehrfach durchgeführt und die transformierten Zellen anschließend auf LB-Agarplatten ausplattiert, denen zusätzlich die Antibiotika Ampicillin oder Ampicillin in Kombination mit Kanamycin zugefügt worden waren. Dadurch bieten diese Platten eine zweifache Selektion. Durch die Zugabe von Ampicillin wird auf Zellen selektioniert, die durch die Elektroporation das Plasmid des benutzten Vektors (Blueskript SK-) mit dem Gen für die Ampicillinresistenz enthalten. Da die Platten auch keine ALA enthalten, wird zusätzlich auf solche *E. coli*-Zellen selektioniert, die durch die Transformation keine externe ALA mehr zum Wachstum benötigen. Bei der Deletionsmutante EV 61 kommt noch ein zusätzlicher Selektionsfaktor hinzu. In das *hemA*-Gen in dieser Mutante wurde eine Kanamycinkassette inseriert (Verkamp *et al.*, 1989). Diese ermöglicht es der Mutante, auf LB-Agarplatten mit dem Antibiotikum Kanamycin zu wachsen. Dieser zusätzliche Selektionsfaktor vermindert das Risiko, daß falsch-positive Klone, z.B. Revertanten, durch die Transformation angezogen werden. Die Zellen wurden auf den Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag das Wachstum der Transformanten kontrolliert.

Nach der Transformation wurden aus den anwachsenden Zellkolonien der Selektionsplatten Plasmide isoliert und diese in einer zweiten Transformation eingesetzt. Erst wenn diese wieder erfolgreich verlief, wurden die Klone weiter bearbeitet. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um tatsächliche Transformanten zu erhalten und falsch-positive Klone auszuschließen.

Durch diese Methode konnten drei positive Klone der Deletionsmutante EV 61 und ein positiver Klon der Mutante GE 1387 isoliert werden. Diese vier Klone wurden zur näheren Identifizierung weiter bearbeitet.

##### 4.4.2 Identifizierung der komplementierten Klone

Die, wie in Kapitel 4.4.1 geschildert, erfolgreich transformierten und selektierten *E. coli*-Zellen wurden unter den der jeweiligen Mutante entsprechenden Selektionsbedingungen in 3 ml LB-Flüssigkulturen über Nacht angezogen (Kap. 3.1.3) und anschließend die Plasmid-DNA isoliert (Kap. 3.5.5). Um die Größe der in den Vektor Blueskript SK- einklonierten Inserts zu bestimmen, wurde mit den isolierten Plasmiden eine Restriktionsenzym-Analyse durchgeführt. Dabei wird festgestellt, ob die Restriktionsschnittstellen *Eco RI* und *Xho I* auch noch nach dem Klonieren in der Multiple-Cloning-Site (MCS) des Vektors vorhanden sind. *Eco RI* und *Xho I* sind die an die cDNA synthetisierten Adaptoren, mit denen die cDNA Banken gerichtet in den Phagen-Vektor Lambda Zap II einkloniert wurden. Anschließend wurde das Insert mit zwei Restriktionsenzymen aus der MCS herausgeschnitten und die Größe des Inserts zu bestimmt. Bei einer vollständigen Komplementation des *hemA*-Gens durch das Gen aus den cDNA Banken wäre ein Insert einer Größe zwischen 1,6 und 2,0 kbp zu erwarten (Tabelle 1 in der Einleitung). Bei 2 Klonen der Mutante EV61 konnte durch Restriktionsanalyse ein Insert von ca. 400 bzw. 900 bp reproduzierbar dargestellt werden. Aus

den anderen zwei Klonen ließen sich durch Restriktionsanalyse keine Inserts herausschneiden, da sich keine cDNA in dem Plasmid befand.

Nur die Klone, bei denen sich durch Restriktionsendonukleasen reproduzierbar ein, wenn auch zu kleines, Insert herausschneiden ließ, wurden, wie in Kap. 3.10.1 beschrieben, ansequenziert und durch Datenbankrecherche mit bestehenden *hemA*-Gen-Sequenzen anderer Organismen, wie unter Kap. 3.10.4 beschrieben, verglichen. Es wurden jedoch keine signifikanten Identitäten oder Ähnlichkeiten zu den *hemA*-Genen anderen Organismen gefunden.

Eigene Untersuchungen zum Wachstum an der Mutante GE 1387 zeigten, daß sich nach einer Inkubation von 2-5 Tagen auf LB Medium ohne ALA kleine Kolonien bildeten. Ähnliche Beobachtungen wurden für die Inkubation der Mutante EV 61 auf M9-Medium ohne ALA gemacht. Hier wurde ein Wachstum kleiner Kolonien nach ca. 4-6 Tagen beobachtet. Dieser Befund wird im folgenden noch diskutiert.

#### 4.5 Diskussion zu Kapitel 4.4

Durch die Komplementation von *hemA*-Gen defizienten *E.coli*-Mutanten konnten bereits verschiedene cDNA Sequenzen, sowohl von prokaryontischen, wie auch von eukaryontischen Organismen kloniert und anschließend sequenziert werden (Vothknecht, 1996). Zum Zeitpunkt der in dieser Arbeit durchgeführten Komplementationsexperimente mit cDNA aus *Scenedesmus* war nur die Sequenz des *hemA*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* bekannt. Die erste, erfolgreiche Klonierung eines *hemA*-Gens aus einem eukaryontischen Organismus wurde durch Komplementation mit der entsprechenden cDNA von *Arabidopsis thaliana* durchgeführt (Ilag *et al.*, 1994). Weiterhin konnten durch Komplementation die *hemA*-Gene von *Cucumis sativus* (Tanaka *et al.*, 1996), und *Hordeum vulgare* (Bougri und Grimm 1996a, 1996b) kloniert werden.

Bei der *hemA*-Gen defiziente Mutante GE 1387 handelt es sich um eine Mutante, die durch eine Punktmutation im *hemA*-Gen keine ALA synthetisieren kann (Prof. Dr. Dieter Jahn, persönliche Mitteilung). Durch Zugabe von ALA ins Medium kann dieser genetische Defekt substituiert werden, was ein aerobes Wachstum der Mutante ermöglicht. Bei dieser Mutante erfolgte keine Komplementation des *hemA*-Gens mit dem entsprechenden Gen aus *Scenedesmus obliquus*. Da der *E. coli*-Stamm GE 1387 nur eine Punktmutation im *hemA*-Gen trägt, ist eine Reversion dieser Mutation nicht auszuschließen. Dies würde das Wachstum der Bakterien auf Platten ohne ALA erklären, ohne daß eine Komplementation erfolgt war. Die Selektion auf Grund der Anwesenheit von Ampicillin in den Platten wurde durch die Transformation des Vektors Blueskript SK- aufgehoben, da die Ampicillinresistenz in die Multiple-Kloning-Site inkloniert ist.

Bei der Mutante EV 61 handelt es sich um eine Deletionsmutante, bei der 278 bp aus der für die GluTR kodierenden Sequenz herausgeschnitten und eine, 1,3 kbp lange Bam H I Kanamycinkassette in das *hemA*-Gen inkloniert wurde (Verkamp und Chelm 1989; Verkamp *et al.*, 1992). Aufgrund der Deletion kann diese Mutante ebenfalls nur mit extern zugegebener ALA kultiviert werden. Durch die Deletion im *hemA*-Gen ist eine Reversion dieser Mutation auszuschließen. Ferner ermöglicht die enthaltene Kanamycinkassette das Wachstum auf LB-Agar-Platten, denen zusätzlich das Antibiotikum Kanamycin zugesetzt wurde (Kap. 3.8.3). Dies bedeutet eine zusätzliche Möglichkeit der Selektion transformierter Zellen. Die durch die Transformation des fehlenden Gens aus einer der cDNA-Banken erfolgreich komplementierten Mutanten können daher aufgrund von drei Kriterien selektioniert werden: Keine Überlebensfähigkeit bei Fehlen von ALA in den LB-Agar-Platten, Wachstum trotz Anwesenheit von Kanamycin durch die inklonierte Kanamycinresistenz und die Ampicillinresistenz durch den Vektor Blueskript SK-. Mit Hilfe dieser Selektionsfaktoren konnte gezeigt werden, daß diese Mutante nicht mit dem *hemA*-Gen aus *Scenedesmus obliquus* komplementiert worden war. Vielmehr wurde ein Wachstum nicht komplementierter Zellen auf LB-Agar-Platten mit Kanamycin, aber ohne ALA, beobachtet. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Verkamp und Chelm (1989) überein, die diskutieren, daß die Deletion der Mutante EV 61 zwar die Expression der GluTR aus *E.coli* verhindert, das Fehlen einer funktionsfähigen GluTR aber nicht letal für den Organismus ist. Sie schlagen vor, daß *E. coli* seinen Energiehaushalt, ähnlich wie *Pseudomonas aeruginosa*, unter fermentativen Lebensbedingungen über den Arginin-Deiminase-Weg, also ohne Atmung und die dazu notwendigen Häme, bestreiten kann (Hungerer, 1995). Dies könnte ein Wachstum der Mutante auf LB-Agar-Platten ohne ALA und ein Wachstum der falsch-positiven Klone auch bei den hier geschilderten Experimenten erklären.

#### 4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Da die bisherigen Versuche, mit Hilfe der Komplementation die GluTR aus *Scenedesmus* zu klonieren, nicht erfolgreich waren, erschien es sinnvoll, homologe DNA-Sonden für das *hemA*-Gen, das für die GluTR aus *Scenedesmus obliquus* kodiert, zu erstellen. Um diese Sonden zu erhalten, wurde versucht, Teilsequenzen des gesuchten *hemA*-Gens mit Hilfe der PCR-Technik zu amplifizieren. Die Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden aus hochkonservierten Sequenzen des *hemA*-Gens verschiedener Organismen abgeleitet.

##### 4.6.1 Ableitung von Oligonukleotid-Primern aus konservierten Sequenzen des *hemA*-Gens verschiedener Organismen

Durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit abgeleiteten Primern sollte aus hochkonservierten Sequenzbereichen des *hemA*-Gens eine Teilsequenz der GluTR aus *Scenedesmus obliquus* amplifiziert werden. Die Ableitung der Oligonukleotidprimer für die PCR erfolgte aus einem Aminosäurevergleich, der freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Jahn zur Verfügung gestellt wurde. Die für den Vergleich verwendeten, überwiegend von prokaryontischen Organismen stammenden Sequenzen und die Größen von deren *hemA*-Genen sind in Tab. 3 aufgelistet.

ORGANISMUS	GRÖSSE des Gens	AUTOREN
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1629 bp	Ilag <i>et al.</i> , 1994
<i>Clostridium josui</i>	1547 bp	Fujino <i>et al.</i> , 1995
<i>Escherichia coli</i>	1321 bp	Verkamp, 1989
<i>Bacillus subtilis</i>	1569 bp	Hansson <i>et al.</i> , 1991
<i>Chlorobium vibrioforme</i>	1565 bp	Majumdar <i>et al.</i> , 1991
<i>Synechocystis</i> sp.	1676 bp	Verkamp <i>et al.</i> , 1992
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1166 bp	Hungerer <i>et al.</i> , 1995

Tab. 3:

Organismen, deren *hemA*-Sequenzen zu Zeitpunkt der Ableitung der Oligonukleotid-Primer bekannt waren und dafür verwendet wurden.

Es wurden insgesamt vier degenerierte Primer abgeleitet (Tab. 4), die in drei Paarungen für die PCR eingesetzt wurden. Die Ableitung erfolgte unter Verwendung einer von Stolz (1995, pers. Mitteilung) erstellten Codon-Usage für *Scenendesmu obliquus*. Am Beispiel der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *Arabidopsis thaliana* sind die Bereiche, aus denen die einzelnen Primer abgeleitet wurden, dargestellt. Tabelle 4 zeigt die Aminosäure- und Nukleotidsequenz der eingesetzten Primer, wobei auch gewobbelte Basen mit aufgezeichnet sind.

```

MAVSSAFVGC PKLETTLLNHHI NLSFSSSSSS SVSQTPLGLN GYRVLPKNNR
TRRGLIQKAR CVLSASSDSA SNAASISALE QLKNSAADRY TKERSIVVI
GLSTETAPVE MREKLAIPEA EWPRATAELC GLNHIEEAAV LSTCNMEIY
VLAISQHRGV KEVTEWMENT SCIPVSETCQ HRFLLYNKDA TQHIFEVSAG
LDELVLGEGQ LLAQVKQVVK VGQGVNGFGR NISGLFKHAI TVGKRVRTET
NLAEGAVSVS SAAVELALMK LPQSSNV SAR MCVIGAGKMG LLVTKHIMAK
GUTKVVVVNR SEERVSAIRE EMPGIEIYR PI DFMIA CAS EADVVTSTA
SETPLFLKEH VENLPQASPE VGGLRHFVDI SVPRNVGSCV GEVETARVYN
VDDLKEVVAA NKEDRMRKAM EAQTIITTES TQFEAWRDSL ETVPTIKKLK
AYAERIRVAE LEKCM SKMGD DTNKKTTTRAV DDLSRGIVNR FLHGPMQHLR
CDGSDSRTL S PTLNMMHALN RMYGLEKDIL EEKLLKAMAEQ QHK

```

Abb. 9:

Aus den hochkonservierten, hier herausgehobenen und unterstrichenen Bereichen der Sequenz wurden die Primer für die PCR abgeleitet. Primer GluTR A ist fett und einfach unterstrichen, die Primer GluTR B und GluTR B revers fett und doppelt unterstrichen und der Primer GluTR C revers *fett und kursiv* hervorgehoben.

<p>GluTR A</p> <p>V L S T C N R M E I/L</p> <p>5'-GTG CTG (AT)(GC)C AC(AC)T TGC AAC CGC (AC)TG GAG A(CT)(GC)TA-3'</p>
<p>GluTR B</p> <p>L V L G E G Q I L</p> <p>5'-CTG GT(GCT) CTG GG(AC)T GAG GG(AC)T CAG AT(CT) AT-3'</p>
<p>GluTR B (revers)</p> <p>G A L T L T G H G</p> <p>5'-CAG (AG)TA CTG (AG)CC CTC (AG)CC CAG (AG)AC CAG-3'</p>
<p>GluTR C (revers)</p> <p>V D L A L P R D I</p> <p>5'-GAT (AG)TC GCG (AG)GG CAG (AG)GC CAG (AG)TC (GC)AC-3'</p>

Tab. 4:

Ableitung der degenerierten Oligonukleotid-Primer aus hochkonservierten Aminosäuresequenzbereichen der GluTR aus den in Tab. 3 aufgeführten Organismen. In der ersten Zeile ist jeweils die Aminosäuresequenz, in der zweiten jeweils die Nukleinsäuresequenz angegeben. Die in den Klammern aufgeführten Nukleotide wurden gewobbelt.

Der Primer GluTR A hatte eine Länge von 32 Basen mit sieben "Wobble"-Positionen. Dies ergab für diesen Primer ein Gemisch von 128 verschiedenen Oligonukleotiden mit einem GC-Anteil von 57,3 %. Die Primer GluTR B und GluTR B revers hatten eine Länge von 28 Basen mit je sieben "Wobble"-Positionen. Daraus ergab sich für diese Primer ein Gemisch von ebenfalls 128 Oligonukleotiden. Der Primer GluTR B hatte einen GC-Anteil von 60,8 % und der Primer GluTR B revers einen solchen von 62,3 %. Der Primer GluTR C revers hatte eine Länge von 27 Basen mit einem GC-Anteil von 66,7 %. Die 5 Wobble-Positionen dieses Primers ergaben ein Gemisch von 32 verschiedenen Oligonukleotiden. Aus dem Abstand der Primer in den zur Ableitung der Oligonukleotid-Primer verwendeten Aminosäuresequenzmotiven ergaben sich theoretisch drei Möglichkeiten für entstehende PCR-Produkte mit unterschiedlichen Größen, die in Tab. 5 zusammengefaßt sind.

Primer-Kombination	Theoretisch zu erwartende Größe der PCR-Produkte
1) GluTR A + GluTR B revers	222 bp

2) GluTR A + GluTR C revers	760 bp
3) GluTR B + GluTR C revers	582 bp

Tab. 5:

Verwendete Kombinationen der abgeleiteten Primer für die PCR und ihre theoretischen Produktgrößen.

Die aus der Polymerasekettenreaktion resultierenden Produkte wurden isoliert, kloniert und sequenziert. Bei hinreichender Identität der isolierten Teilsequenzen zu den *hemA*-Gen-Sequenzen aus Bakterien und Pflanzen wurden diese dann als homologe Hybridisierungs sonden eingesetzt.

#### 4.6.2 Amplifikationsexperimente mit cDNA als Template-DNA

Zur Synthese einzelsträngiger cDNA wurde angereicherte Poly(A)-mRNA (Kap. 3.5.4) eingesetzt, die durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. Die Poly(A)-mRNA wurde aus der 4 h belichteten Mutante C-2A von *Scenedesmus obliquus* isoliert. Die erhaltene, einzelsträngige cDNA wurde als Template-DNA zusammen mit den unter 4.5.1 aufgeführten Kombinationen an Primern für die PCR-Experimente eingesetzt. Mit dieser cDNA konnten allerdings keine PCR-Produkte amplifiziert werden. Daher wurden die zur Verfügung stehenden cDNA Banken Dauerdunkel (DD) und Dauerlicht (LL) (Richter, 1994) mit Hilfe der *in vivo*-Exision in XL-Blue-Zellen übertragen, die Zellen angezogen und die Plasmide isoliert. Die so gewonnene DNA wurde als Template für weitere PCR-Experimente eingesetzt. Bei der PCR mit den nun zur Verfügung stehenden, verschiedenen Template-DNAs konnte ein Produkt amplifiziert werden. Dieses entstand nur mit der Primerkombination 1 und der Template-DNA aus der DD-cDNA-Bank. Dieses PCR-Produkt hatte eine Größe von ca. 240 bp. Bei PCR-Experimenten mit den Primerkombinationen 2 und 3 entstanden viele unspezifische Produkte, die sich nicht reproduzieren ließen. Ferner traten diese unspezifischen Produkte teilweise auch bei der Anwesenheit von nur einem Oligonukleotid-Primer in der PCR-Reaktion auf. Das oben erwähnte Produkt der PCR-Reaktion mit der Primerkombination 1 entstand nur bei der Anwesenheit beider Oligonukleotid-Primer im Reaktionsansatz. In Kontrollreaktionen mit der Primerkombination 1, bei denen jeweils nur der Sense- oder Antisense Primer in die Reaktion eingesetzt wurde, trat das Produkte nicht auf. Das ca. 240 bp große DNA-Fragment, konnte reproduzierbar aus mehreren unabhängigen PCR-Ansätzen amplifiziert werden.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Reaktionsansätze wurde die im mit Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gel sichtbare, 240 bp große DNA-Bande aus dem Gel eluiert (Kap.3.6.3) und als Template-DNA in neuen PCR-Reamplifizierungsexperimenten (Kap. 3.9.2) eingesetzt. Es wurde versucht, auf diesem Wege ausreichend DNA zu erhalten, um eine Direktsequenzierung des PCR-Produktes durchführen zu können. Es konnte aber keine, zumindest für eine Direktsequenzierung ausreichende Menge an DNA des 240 bp Produktes reamplifiziert werden bzw. in ausreichender Menge aus dem Agarosegel eluiert werden. Daher wurde das PCR-Produkt in einen Vektor einkloniert.



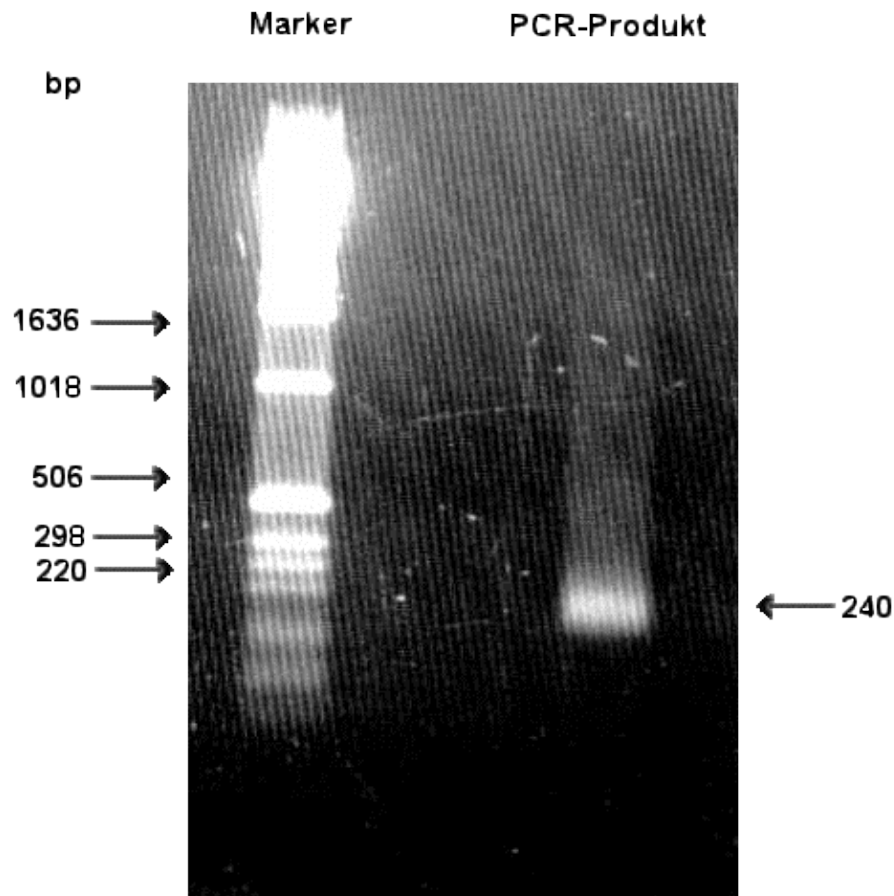


Abb. 10:

Die Abbildung zeigt das im Agarose-Gel auf eine Größe von 240 bp abgeschätzte PCR-Produkt, das aus der Primerkombination 1 amplifiziert werden konnte.

#### 4.6.3 Klonierung und Sequenzierung des entstandenen PCR-Produktes

Das reproduzierbar erhaltene, 240 bp lange PCR-Produkt wurde zur weiteren Charakterisierung mit Hilfe des pMOSBlue T-Vector Kits in einen pMOSBlue Vektor durch Ligation, wie in Kapitel 3.9.3 beschrieben einkloniert. Der rekombinante Vektor wurde dann durch Transformation in *Escherichia coli* XL-1-Blue Zellen eingeführt. Die Selektion der erfolgreich transformierten Zellen erfolgte nach dem sogenannten "Blau-Weiß"-Screening (Kap. 3.9.3) auf Agarplatten mit Ampicillin und Tetracyclin. Die erfolgreich transformierten Zellen wurden dann in 3 ml LB-Flüssigkulturen mit Ampicillin angezogen, die Plasmid-DNA isoliert und die Nukleinsäuresequenz durch Sequenzierung ermittelt.

In Abbildung 11 ist die Nukleotidsequenz des PCR-Produktes, das ausgehend von der DD-cDNA Bank amplifiziert werden konnte, dargestellt. Dieses PCR-Produkt wurde im Agarose-Gel auf eine Größe von 240 bp abgeschätzt. Es wird im nachfolgenden als PCR-Produkt B1 bezeichnet. Durch Sequenzanalyse des PCR-Produktes B1 konnte die exakte Größe auf 222 bp bestimmt werden.

**caggatctgccctcaccaggaacagaatctggcccttcgccagaacc**  
**agagagtcagggccgcccggacacaccgacgaggtgggtgggtggcacc**  
**ctgtccctcagcaggaacaggttaaggccgcagctcgtcaagcgcaccgg**  
**gaagacttgcctgagccgcctccacctcgcgcacccacgggtgccaggag**  
**acagccacgcacatacgtctccatgcgggttcgaagtggacagcaca**

Abb. 11:

Nukleotidsequenz des 222 bp langen PCR-Produktes B1

Die Sequenz des Down-Stream-Primers ist kursiv und fett, die Sequenz des Up-Stream-Primers unterstrichen dargestellt.

#### 4.6.4 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des PCR-Produktes B1 mit Aminosäuresequenzen anderer Glutamyl-tRNA-Reduktasen

Aus der Nukleotidsequenz des PCR-Produktes B1 wurden die Aminosäuresequenzen aller drei möglichen Leserahmen abgeleitet. Bei Anwendung von Leserahmen -2 ergab sich die beste Übereinstimmung mit Aminosäuresequenzen anderer Glutamyl-tRNA-Reduktasen. Der computergestützte Vergleich dieser Teilsequenz mit den entsprechenden Aminosäure-Teilsequenzen anderer Glutamyl-tRNA-Reduktasen erfolgte mit dem Programm DNASIS 1.10 für Windows. Die Analyse der *Scenedesmus*-Sequenz auf Aminosäureebene ergab Identitäten von 62,8 % zu *Hordeum vulgare*, von 52,9 % zu *Arabidopsis thaliana* und von 55,7 % zu *Cucumis sativus*. In einem weiteren Vergleich wurden auf der Basis der abgeleiteten Aminosäuren die Ähnlichkeiten zwischen der Aminosäuresequenz der GluTR aus *Scenedesmus* und den Aminosäuresequenzen anderer Organismen ermittelt. Es ergaben sich Ähnlichkeiten von 74,3 % zu *Hordeum vulgare*, von 71,4 % zu *Arabidopsis thaliana*, und von 68,6 % zu *Cucumis sativus*. Wegen der hohen Identitäten der GluTR aus *Scenedesmus* mit denen aus anderen Organismen sollte das PCR-Produkt als Sonde für Southern- und Northern-Blot Analysen, sowie für das Screenen der cDNA-Banken DD und LL eingesetzt werden und wurde daher mit Hilfe der PCR-Technik DIG-markiert.

In Abb. 12 ist ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des PCR-Produktes B1 mit den Aminosäuresequenzen des *hemA* 1- und des *hemA* 2-Genproduktes verschiedener Pflanzen dargestellt. Für die Pflanzen *Arabidopsis* und *Cucumis* ist in der ersten Reihe die abgeleitete HemA 1- und in der zweiten Reihe die HemA 2 Sequenz dargestellt. Die identischen Aminosäuren zwischen HemA 1 und HemA 2 von *Arabidopsis* und *Cucumis* sind durch horizontale Striche gekennzeichnet. Bei den Aminosäuren, in denen sich die Sequenzen unterscheiden, wurde der horizontale Strich gegen den jeweiligen "ein Buchstaben-Kode" der kodierten Aminosäure ersetzt.

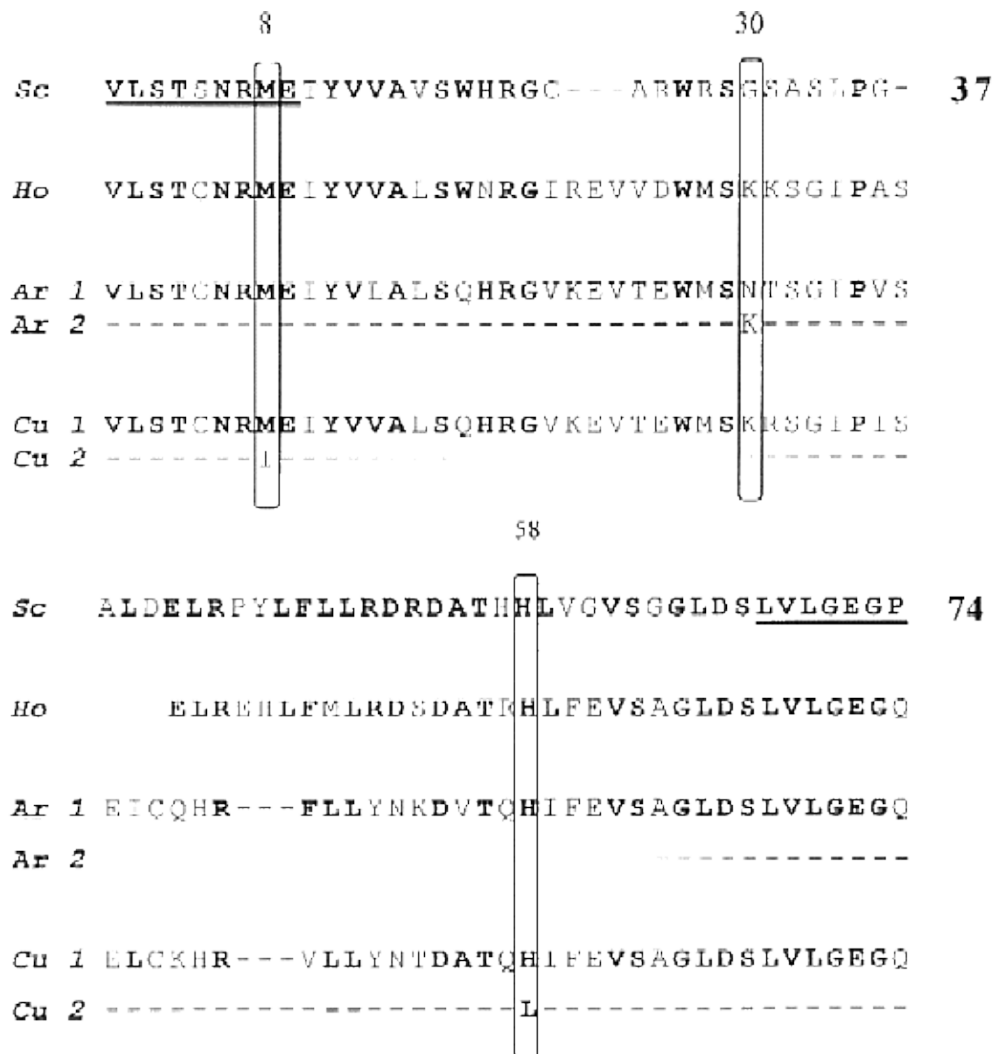


Abb. 12:

Vergleich der Aminosäuresequenzen des PCR-Produktes B1 mit den Aminosäuresequenzen des *hemA* 1- und des *hemA* 2-Genproduktes verschiedener Pflanzen. Die Kürzel für die Organismen beduten: **Sc** = *Scenedesmus obliquus*, **Ho** = *Hordeum vulgare*, **Ar** = *Arabidopsis thaliana*, **Cu** = *Cucumis sativus*. Die fett gedruckten Buchstaben zeigen die Übereinstimmung der *Scenedesmus*-Sequenz mit denen der aufgeführten Pflanzen. Die Sequenz des Down-Stream-Primers ist doppelt unterstrichen, die des Up-Stream-Primers einfach unterstrichen dargestellt.

#### 4.6.5 Vergleich der Aminosäuresequenz des PCR-Produktes B1 mit Sequenzen anderer Glutamyl-tRNA-Reduktasen, die durch das *hemA* 2-Gen kodiert werden.

Erst kürzlich wurde ein zweites *hemA*-Gen in den Pflanzen *Arabidopsis thaliana* (Kumar und Söll, 1996) und *Cucumis sativus* (Tanaka *et al.*, 1996) entdeckt. Das Genprodukt des *hemA* 2-Gens ist im Gegensatz zu dem Genprodukt von *hemA* 1 nicht lichtreguliert und konnte nur in allen nicht ergrünenden Pflanzenorganen, wie den Wurzeln und Blüten von *Arabidopsis thaliana* und *Cucumis sativus*, durch Southern Blot Experimente nachgewiesen werden. Die Autoren postulieren das Vorkommen von zwei Glutamyl-tRNA-Reduktasen und einen möglichen zweiten C<sub>5</sub>-Weg. Sie diskutieren weiterhin, daß das Genprodukt des *hemA* 1-Gens im Biosyntheseweg der Chlorophylle und das Genprodukt des *hemA* 2 in der Hämbiosynthese involviert ist. Daraus ergibt sich die Frage, mit welcher Aminosäuresequenz, der von *hemA* 1 oder der von *hemA* 2, das PCR Produkt B1 aus *Scenedesmus* höhere Identitäten aufweist. Wie Abbildung 12 zeigt, unterscheidet sich bei

*Arabidopsis thaliana* die HemA 2-Sequenz von der HemA 1-Sequenz in der Position 30. Hier wird das Lysin durch ein Asparagin ersetzt. Die Identität im Vergleich aller Aminosäuren liegt bei 52,87 %. Bei *Cucumis sativus* unterscheidet sich die HemA 2 von der HemA 1 Sequenz zum einen in Position 8, wo das Isoleucin durch ein Methionin und zum zweiten in Position 58 wo ein Isoleucin durch Leucin ersetzt ist (Abb. 12). Da das Leucin in dieser Position im HemA 1 aber identisch mit dem Leucin in der Sequenz von *Scendesmus obliquus* ist, unterscheidet sich diese Sequenz in nur einer Aminosäure. Die Identität des PCR-Produktes B1 Aminosäurevergleich im gesamten liegt hier bei 51,42 %.

## 4.7 Diskussion zu Kapitel 4.6

Ausgehend von einem Aminosäurevergleich, welcher überwiegend nur mit Sequenzen von prokaryontischen Organismen durchgeführt werden konnten, wurden 4 Primer abgeleitet und in einer Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Mit diesen Primern konnten 3 Primer- kombinationen erstellt werden, die unterschiedlich große PCR-Produkte erwarten ließen. Mit der Primerkombination 1 (Kap. 4.6.1) konnte ein 222 bp langes PCR-Produkt reproduzierbar amplifiziert werden. Die Größe des amplifizierten PCR-Produktes wurde durch Agarose Gel-Elektrophorese auf ca. 240 bp abgeschätzt. Durch Sequenzanalyse konnte die genaue Größe des PCR-Produktes B1 von 222 bp bestimmt werden. Somit entspricht dieses Produkt der theoretisch erwarteten Größe. Für die PCR wurden degenerierten Oligonukleotid-Primer eingesetzt. Die Sequenz des Up-Stream-Primers und die Sequenz des Down-Stream-Primers wurden in dem PCR- Produkt B1 wiedergefunden. Es konnte somit gezeigt werden, daß es sich beim Bereich der Primer um hochkonservierte Sequenzbereiche handelt und die richtige Region zur Ableitung der PCR-Primer ausgewählt wurde. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des PCR-Produktes B1 mit den Aminosäuresequenzen bisher veröffentlichter Hem A1 Sequenzen anderer eukaryontischer Organismen ergab Identitäten zwischen 52,8 % und 62,8 %, sowie Ähnlichkeiten zwischen 68,6 % und 74,3 % (Kap. 4.6.4). Auch für das in der Reaktionssequenz nächste Enzym des C<sub>5</sub>-Weges aus *Scenedesmus obliquus*, der Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase, konnten ähnlich hohe Identitäten zu *Hordeum vulgare* und *Arabidopsis thaliana* auf Aminosäureebene gefunden werden (Stolz, 1995).

Die Existenz eines zweiten *hemA*-Gens ist seit jüngerer Zeit für die Pflanzen *Arabidopsis thaliana* (Kumar und Söll, 1996) und *Cucumis sativus* (Tanaka *et al.*, 1996) dokumentiert und ein zweiter C<sub>5</sub>-Weg wird diskutiert. Durch einen Vergleich der Sequenzen auf Aminosäureebene wurde festgestellt, ob es sich bei dem PCR Produkt B1 um einen Sequenzabschnitt des *hemA* 1 oder *hemA* 2 handelt. Aufgrund der großen Identitäten der beiden *hemA* Gene der oben aufgeführten Pflanzen in diesem Bereich konnte das 222 pb lange PCR-Produkt B1 folglich weder dem *hemA* 1-, noch dem *hemA* 2-Gen von *Arabidopsis* oder *Cucumis* zugeordnet werden.

#### 4.8 Southern-Blot-Experimente mit dem DIG-markierten, 222 bp langen PCR- Produkt B1

Mit Hilfe eines Southern-Blot-Experimentes mit dem DIG-markierten, 222 bp langen PCR-Produkt B1 sollte die Frage geklärt werden, ob dieses PCR-Produkt nur ein einzelnes Gen repräsentiert. Es wurde in einem Southern Blot als Sonde zur Hybridisierung mit genomischer DNA aus dem Wildtyp D3 von *Scenedesmus obliquus* eingesetzt (Abb. 13). Für den Restriktionsverdau der genomischen DNA wurden die Restriktionsenzyme *Bam* HI, *Eco* RI, *Bgl* II, *Hind* III und *Pst* I eingesetzt.

Durch den Einsatz dieser Restriktionsenzyme konnte die genomischen DNA in unterschiedlich große Fragmente gespalten werden. In den Spuren A,B,D und E des Restriktionsverdaus hybridisierte, unabhängig von der Größe, jeweils nur ein DNA-Fragment mit der DIG-markierten Sonde. Der Blot wurde stringent bei 68 °C mit 0,5 SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Es konnten ein 9,4 kBp (A), ein 6,5 kBp (B), ein 22,2 kBp (C), ein 5,0 kBp (D) und ein 0,36 kBp langes Fragment nachgewiesen werden. Nur in Spur C könnte man diskutieren, daß das verwendete Restriktionsenzym *Bgl* II die hybridisierende genomische-DNA ein zweites mal schneidet. Anhand des gezeigten Hybridisierungsmusters kann man aber davon ausgehen, daß dieses PCR-Produkt nur durch ein Gen im Genom von *Scenedesmus obliquus* repräsentiert ist.

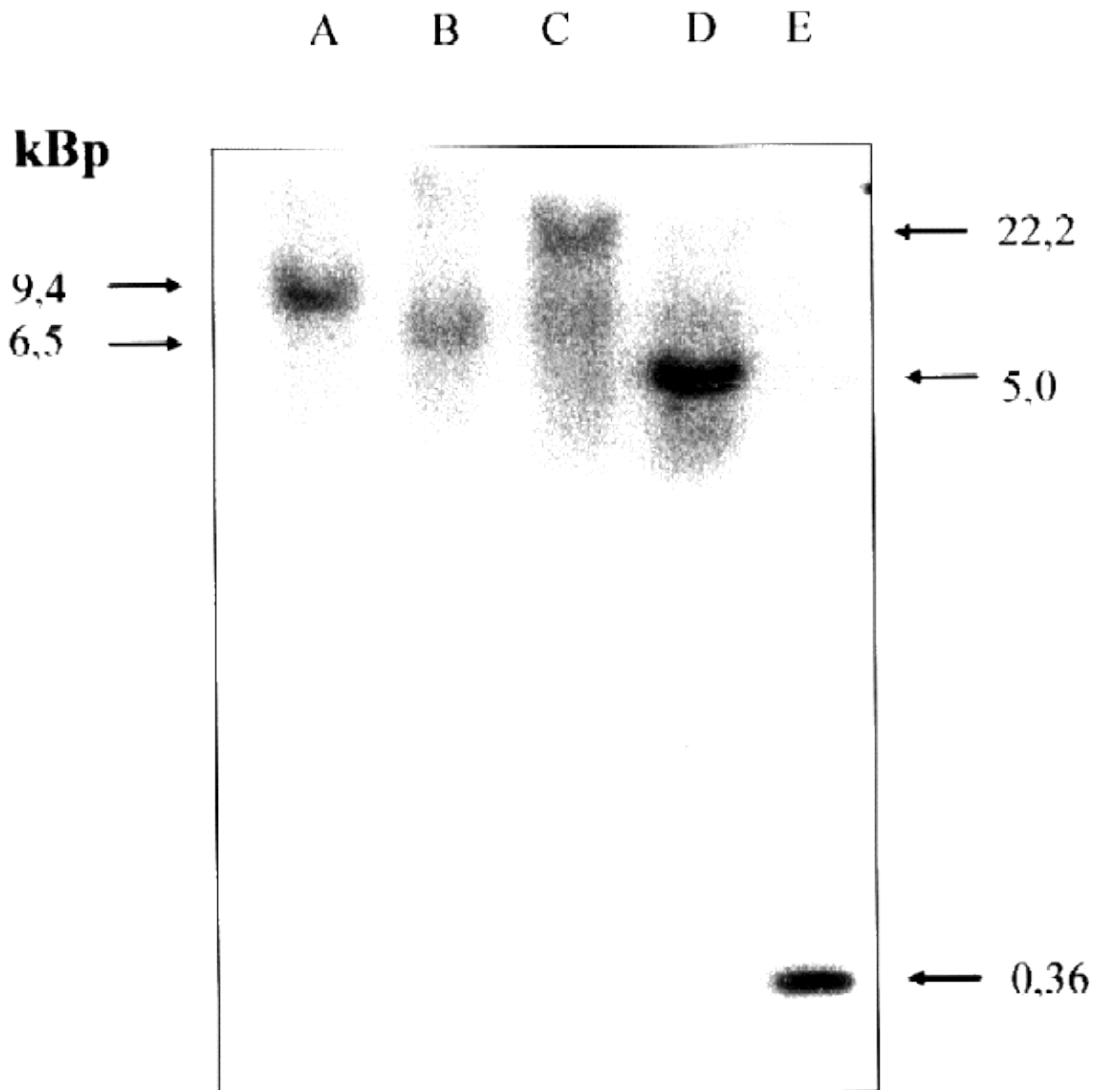


Abb. 13:

Southern-Blot mit dem DIG-markierten, 222 bp langen PCR-Produkt B1. Genomische DNA wurde mit den Restriktions-enzymen *Bam HI* (A), *Eco RI* (B), *Bgl II* (C), *Hind III* (D) und *Pst I* (E) geschnitten.

## 4.9 Diskussion zu Kapitel 4.8

Um die Anzahl der Kopien von *hemA*-Genen in der genomischen-DNA von *Scenedesmus obliquus* zu ermitteln, wurden Southern-Blot-Experimente durchgeführt. Dazu wurden 10 µg genomische DNA aus dem Wildtyp von *Scenedesmus obliquus* mit den Restriktionsenzymen, *Bam* HI, *Eco* RI, *Bgl* II, *Hind* III, und *Pst* I verdaut (Kap. 3.5.8), die DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und über Southern-Blotting auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit dem durch die PCR-Technik DIG-markierten PCR-Produkt B1. Aus diesem Experiment ergab sich das in Abb. 13 dargestellte Hybridisierungsmuster. Da in 4 von 5 Spuren, eine Ausnahme stellt Spur C dar, nur jeweils ein signifikantes Hybridisierungssignal pro Gelspur auftrat, kann davon ausgegangen werden, daß das Gen der GluTR in *Scenedesmus obliquus* nur in einer Kopie vorliegt. Das zweite Signal in Spur C kann möglicherweise durch eine weitere Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bgl* II in der genomischen DNA hervorgerufen worden sein. Somit würde ein weiteres Fragment der genomischen DNA mit der Sonde B1 hybridisieren. Um dies zu überprüfen wurde das 222 bp lange PCR-Produkt B1 mit Hilfe des Programmes DNASIS 1.10 auf mögliche Restriktionsschnittstellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen untersucht. In der untersuchten Sequenz wurde aber keine Schnittstelle für diese Restriktionsenzyme gefunden. Es könnte somit sein, daß das verwendete Restriktionsenzym *Bgl* II in einem Intron der genomischen DNA schneidet und dieses Fragment möglicherweise mit der Sonde B1 hybridisiert. Der Blot wurde unter sehr stringenten Bedingungen gewaschen (Kap. 4.8), so daß eine unspezifische Hybridisierung mit anderen DNA-Fragmenten sehr erschwert wurde. Unter diesen spezifischen Bedingungen hätten, soweit mehrere *hemA*-Gene vorhanden waren, diese mit der Sonde reagieren müssen.



#### 4.10 Screenen der cDNA-Bibliotheken von *Scenedesmus obliquus* mit der DIG- markierten Sonde B1

Die für das Screening verwendeten cDNA-Bibliotheken DD und LL (Richter, 1994) wurden, wie in Kapitel 3.7.4 beschrieben, mit XL-1-Blue Zellen, die vorher mit Phagen infiziert wurden, auf LB-Platten ausgestrichen. Die Verdünnungen wurden so gewählt, daß ca. 1000 Plaques pro LB-Platte auftraten. Die Phagen-DNA wurde auf eine Hybond-N-Membran, wie in Kapitel 3.7.4 beschrieben, übertragen. Die auf die Membran fixierte Phagen-DNA wurde mit der Sonde B1 hybridisiert und anschließend kolorimetrisch detektiert (Kap. 3.7.6). Die positiv reagierenden Phagenplaques wurden von der Platte isoliert und in mindestens zwei weiteren Schritten selektiert, bis alle auf der LB-Platte vorhandenen Phagen positiv mit der Sonde B1 reagierten. In Abbildung 14 ist ein solcher Replika-Filter eines zweiten Screening-Durchganges dargestellt. Alle in Abb. 14 sichtbaren Plaques sind positiv, wobei um die Anzahl der weiter zu bearbeitenden Plaques gering zu halten, nur die markierten isoliert wurden.

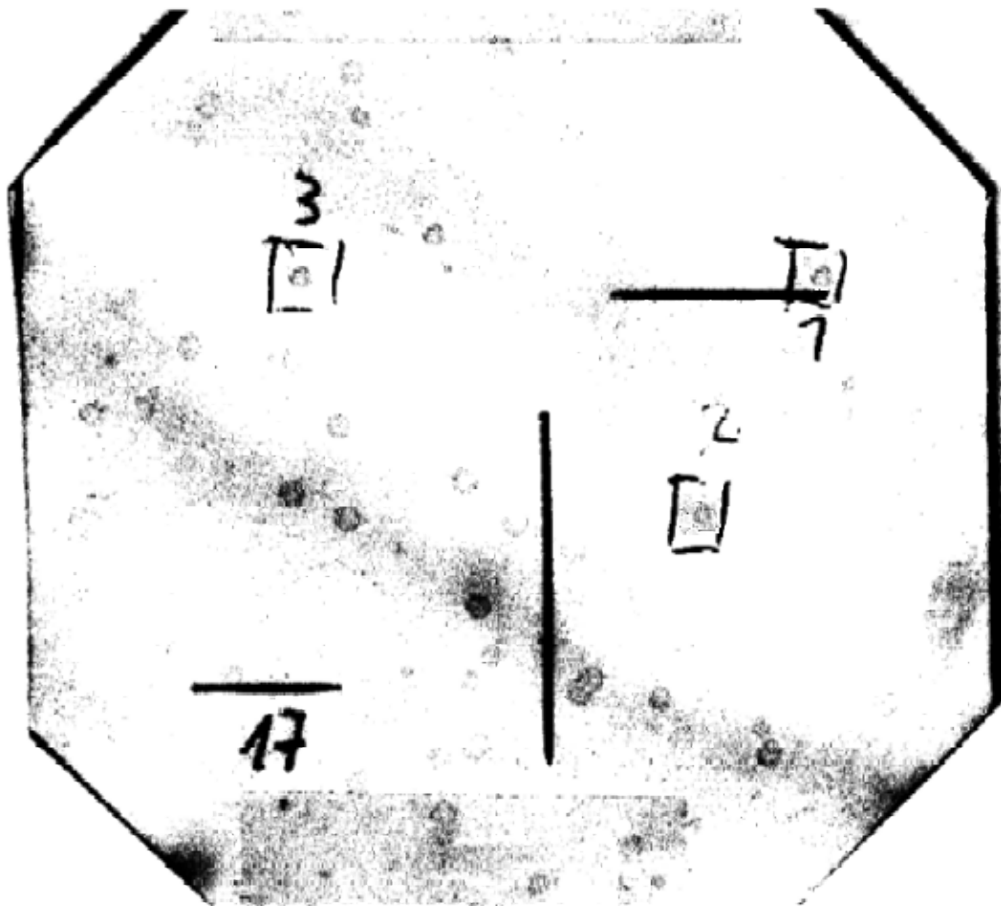


Abb. 14:

Replika-Filter mit positiv reagierenden Phagenplaques, die durch ein zweites Screening mit der DIG-markierten Sonde B1 erhalten wurden.

##### 4.10.1 Restriktionsverdau positiv reagierender Klone

Die aus dem letzten Screening-Zyklus isolierten Phagen wurden durch *in vivo*-Excision im *E.coli*-Stamm XL-1-Blue in DNA des Plasmids Blueskript SK- umgeschrieben. Zur Charakterisierung der Klone wurde eine Plasmid-Minipräparation durchgeführt. Dazu wurde die Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI und *Kpn* I bzw. *Eco* RI und *Xho* I verdaut und über ein Agarosegel (Kap. 3.6) aufgetrennt. Durch Vergleich mit einem 1 kb großen DNA-Marker wurde die Länge der einklonierten, Insert-DNA abgeschätzt.

Es wurden zwei cDNA-Klone isoliert, die als 18b und 20b bezeichnet wurden. Die beiden Klone wurden mit den Restriktionsenzymen *Eco* RI und *Xho* I, sowohl einzeln, als auch doppelt, verdaut und die DNA-Fragmente über ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetrennt. In Abb. 15 ist die Auftrennung der Restriktionsfragmente beider Klone dargestellt. Im Einzelverdau zeigte der Klon 18b, nur eine einzelne, linearisierte Insert-Bande. Im Doppelverdau trat anstatt der zu erwartenden zwei Banden, je eine Vektor- und eine Insert-Bande, und eine zusätzliche dritte Bande auf (Abb. 15). In den Spuren der Einzelverdaue ist jeweils eine Bande in einer Größe von ca. 7 kbp zu sehen. In der Spur des Doppelverdaus sind zwei signifikante Banden einer Größe von ca. 5 und 3 kbp zu beobachten.

Bei Klon 20b wurde im Einzelverdau je nur eine DNA-Bande beobachtet, während nach dem Doppelverdau drei Banden auftraten (Abb. 15 ). Die Größe der Bande im Einzelverdau entspricht ca. 7,3 kbp, die der Banden nach Doppelverdau lag bei ca. 5,3 kbp bzw. 3 kbp. Die Bande bei 3 kbp entspricht der Größe des Vektors, so daß es sich bei der Bande von 5,3 kbp um das Insert handeln muß. Dafür spricht auch, daß die Summe der im Doppelverdau erhaltenen Hauptbanden etwa der Größe von 7,3 kbp, also der Bande im Einzelverdau entspricht. Anhand der Restriktionsanalyse der Klone 18b und 20b ist keine Aussage darüber zu treffen, ob diese beiden Klone das *Scendesmus hemA*-Gen beinhalten. Daher wurde in einem nächsten Experiment die aufgetrennte Plasmid-DNA der beiden Klone mit der Sonde B1 in einem Southern-Blot-Experiment hybridisiert.

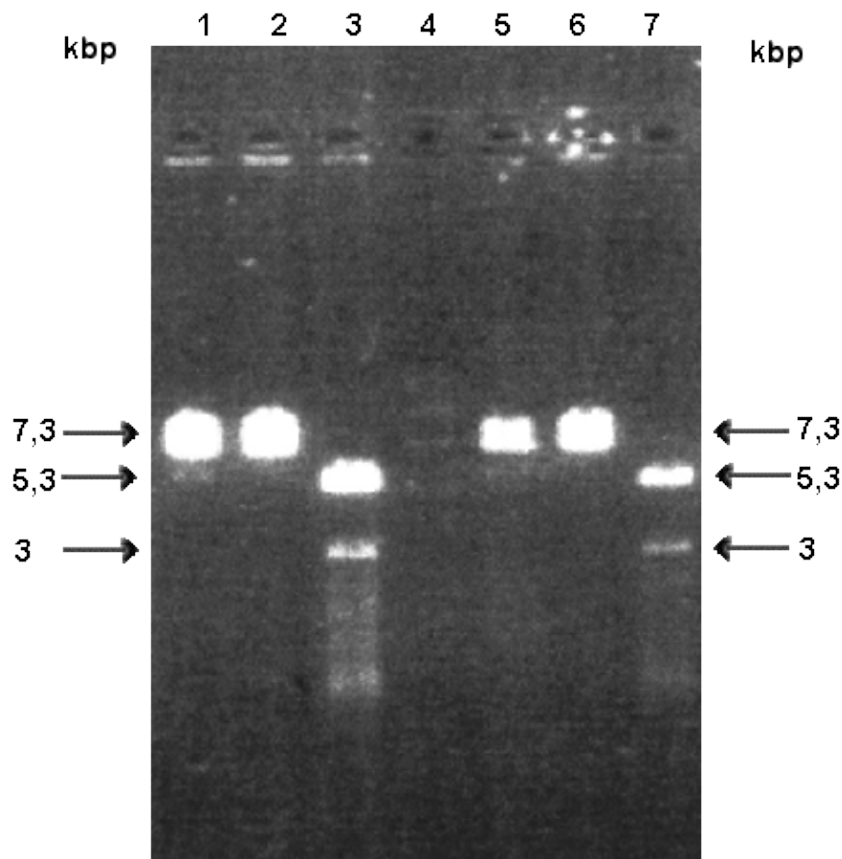


Abb. 15:

Auftrennung der Restriktionsfragmente der Klone 18b und 20b über ein 1,8 %-iges Agarosegel. Die Spuren sind folgendermaßen belegt : (1) Klon 18b verdaut mit *Eco* RI, (2) Klon 18b verdaut mit *Xho* I, (3) Klon 18b verdaut mit *Eco* RI und *Xho* I, (4) -Hind III Marker, (5) Klon 20b verdaut mit *Eco* RI, (6) Klon 20b verdaut mit *Xho* I, (7) Klon 20b verdaut mit *Eco* RI und *Xho* I.

#### 4.10.2 Southern-Blot-Analyse der Klone 18b und 20b mit der Sonde B1

Um festzustellen, ob es sich bei den DNA-Banden der Klone 18b und 20b in Abbildung 15 wirklich um die DNA des *hemA*-Gens handelt, wurden diese durch Southern-Transfer auf eine Hybond-N-Membran geblottet und durch Bestrahlung mit UV-Licht fixiert. Die so fixierte DNA wurde, wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben, mit der Sonde B1 hybridisiert und die DNA-Hybride durch Chemilumineszenz detektiert (Kap. 3.7.5). In Abbildung 16 ist das Hybridisierungsmuster der verdauten Plasmid-DNA der Klone 18b und 20b dargestellt. Die beiden Klone zeigten ein ähnliches Hybridisierungsmuster, sowohl im Einzel-, als auch im Doppelverdau. Es hybridisierten jeweils die Banden beider Klone bei ca. 7,3 kbp im Einzelverdau, wie auch die beiden Banden bei ca. 5,3 kbp im Doppelverdau. Aufgrund der hohen Signalstärke der Bande bei 7,3 kbp kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob es sich möglicherweise um zwei DNA-Banden handelt. Wäre dies der Fall, so würde das eine weitere Schnittstelle für eines der beiden Restriktionsenzyme in diesem 7 kbp großen Plasmid-DNA-Fragment bedeuten. Um diese Frage zu beantworten, erfolgte eine weitere Charakterisierung der Klone 18b und 20b durch DNA-Sequenzierung.

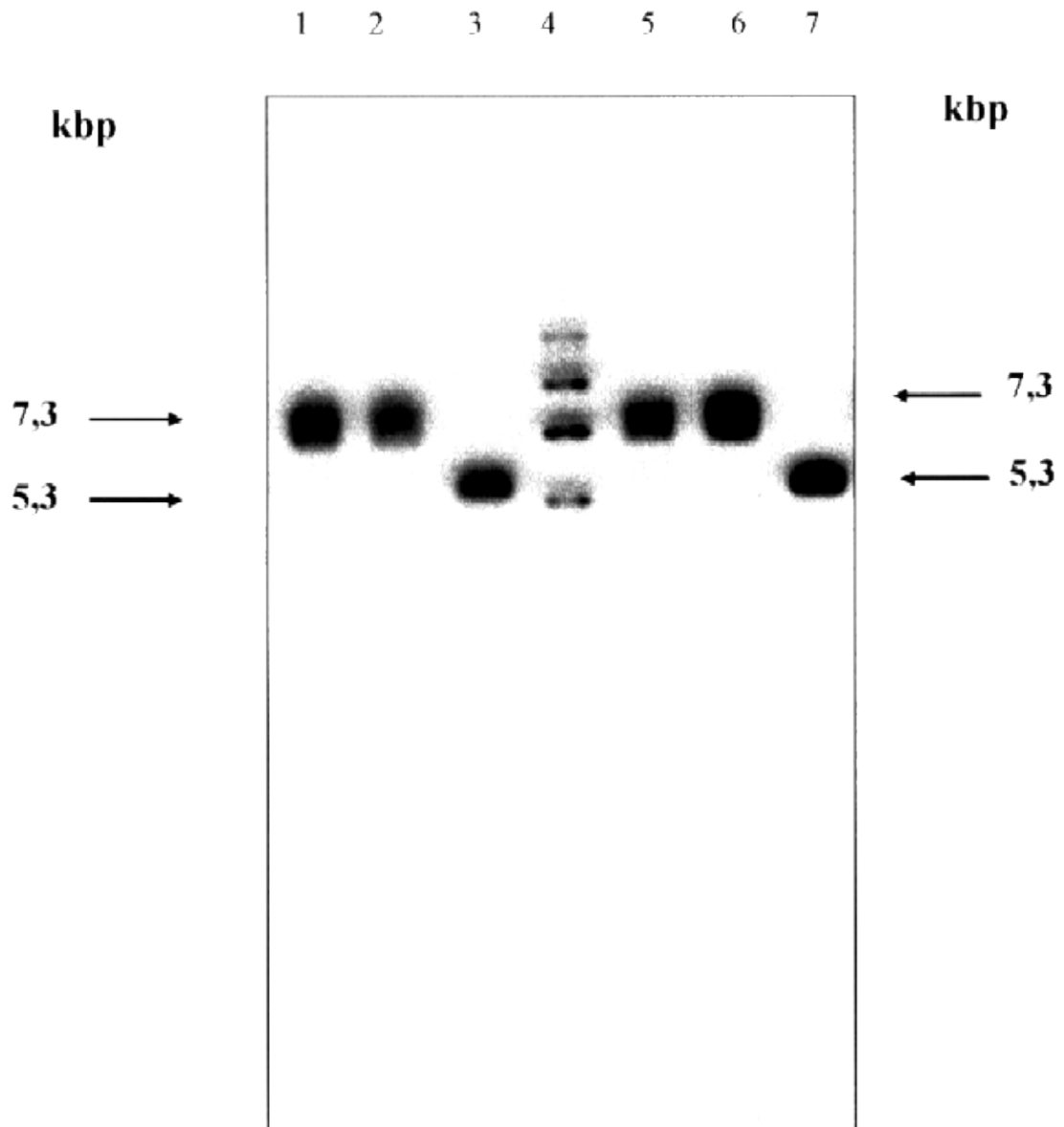


Abb. 16: Southern-Blot mit den durch Restriktionsverdau erhaltenen DNA- Fragmenten der Klone 18b und 20b. Die Spurbelegung entspricht Abb. 15. Die Hybridisierung erfolgte mit der DIG-markierten Sonde B1.

#### 4.10.3 Identifizierung und partielle Charakterisierung des cDNA-Klones 18b durch Sequenzanalyse

Um zu ermitteln, ob es sich bei Klon 18b tatsächlich um einen cDNA-Klon des *hemA*-Gens aus *Scenedesmus obliquus* handelt, wurde das ca. 5,2 kbp große Insert sowohl manuell mit Sequenase 2.0, als auch automatisch ansequenziert. Die manuellen Sequenzierungen wurden mit dem zur Plasmid-DNA des Vektors komplementären Sequenzierprimer -40 durchgeführt. Die automatische Sequenzierung erfolgte mit den zur Plasmid-DNA des Vektors komplementären Sequenzierungsprimern T3 und T7.

Bei der automatischen Sequenzierung wurde der Klon 18b sowohl von der T3-Seite, als auch von der T7-Seite des Vektors über eine Länge von ca. 500 bp ansequenziert.

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden, wie in Kapitel 3.10.4 beschrieben, durch Datenbank-Vergleich mit schon bekannten *hemA*-Gen- Sequenzen anderer Organismen untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß der

Klon 18b, sowohl von der T3, wie auch von der T7 Seite her, keine Ähnlichkeit zu *hemA*-Sequenzen anderer Organismen aufwies. Anstelle dessen wurden, ausgehend von der Sequenzierung mit dem T3 und T7 Primern, hohe Identitäten zu Chlorophyll a/b-Bindeproteinen anderer Organismen gefunden. Die Identitäten mit den Sequenzen anderer Organismen lagen auf Aminosäureebene für bestimmte Bereiche der zum Datenbankvergleich verwendeten Gensequenz, die ausgehend vom Primer T3 für *Scenedesmus obliquus* ermittelt wurden, bei 85 %. Dies deutet darauf hin, daß es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Gen für ein solches Chl a/b-Bindeprotein handelt. Durch Ansequenzieren des Klones 18b mit dem T7-Primer konnten ebenfalls hohe Identitäten zu einem Gen, welches für Chlorophyll a/b Bindeproteine kodiert, ermittelt werden. Hier lag, im Vergleich mit den Sequenzen anderer Organismen, die Identität auf Aminosäureebene bei bis zu 86%.

#### 4.10.4 Identifizierung und Charakterisierung des cDNA-Klones 20b durch Sequenzanalyse

Auch dieser Klon wurde, wie für Klon 18b in Kapitel 4.10.3 beschrieben, mit zwei Methoden ansequenziert und die ermittelten Sequenzdaten zur Datenbank-Recherche verwendet. Die Sequenzdaten, die durch das Ansequenzieren mit dem Primer T3 erhalten wurden, wiesen keine signifikante Identität zu einer Gensequenz anderer Organismen auf. Die durch Sequenzierung mit dem T7 Primer erhaltenen Gensequenz hatte dagegen eine hohe Identität zu *hemA*-Sequenzen anderer Organismen. Die höchsten Identitäten wurden beim Vergleich auf Nukleinsäureebene mit dem *hemA*-Gen aus Gerste (*Hordeum vulgare*) gefunden und betrugen 53%. Beim Vergleich auf Aminosäureebene fanden sich die höchsten Identitäten mit ca. 64% ebenfalls bei Gerste (*Hordeum vulgare*).

Um diesen Klon weiter zu charakterisieren, wurde er einzelsträngig durch Primer-Walking vom 5'-Ende ausgehend soweit sequenziert, bis die Sequenz keine Identität zu anderen *hemA*-Sequenzen mehr aufwies. Durch diese Sequenzierungsstrategie wurden 1511 bp des 4 kbp umfassenden Inserts des Klones 20b bestimmt.

#### 4.10.5 Charakterisierung der 1511 bp langen Insert-Sequenz des Klones 20b

Die Daten der 1511 bp lange Nukleotid-Teilsequenz des Klones 20b wurde mit Hilfe des Programmes DNASIS 1.10 weiter bearbeitet. Zu diesem Zweck wurde die gefundene Sequenz mit *hemA*-Gen-Sequenzen anderer Organismen verglichen. Die Identitäten zu anderen Sequenzen reichten von Base 396 bis zu Base 1331. Die Basen 1 bis 396 des N-terminalen Endes der zum Datenbankvergleich verwendeten Sequenz wiesen keine signifikanten Identitäten zu Gensequenzen aus anderen Organismen auf und sollten daher nicht Teil des *hemA*-Gens sein. Hierbei handelt es sich um die nicht translatierte Sequenz des 5'-Endes. Die Basen 396 bis 1331 wurden als kodierende *hemA*-Sequenz der *Scenedesmus*-cDNA identifiziert, die das N-Terminale Ende einschließlich des Transitpeptides beinhaltet. Den Basen 1332 bis 1511 des 3'-Endes der Sequenz konnte keine Funktion zugeordnet werden. Abbildung 17 zeigt die schematische Darstellung der 1511 bp langen Nukleotidsequenz. *HemA*-Bereiche des aus *Scenedesmus obliquus* isolierten Inserts sind als breiter Balken eingezeichnet.

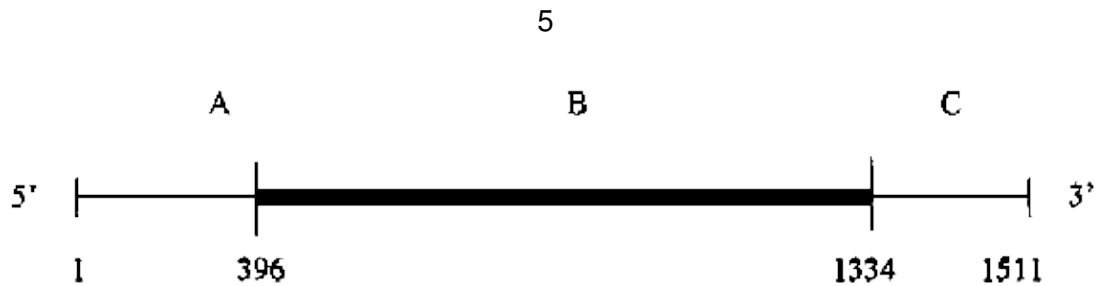


Abb. 17:

Schematische Darstellung der 1511 bp langen Nukleotidsequenz des Klons 20b.

Mit A und C sind die Abschnitte bezeichnet, die keine signifikante Ähnlichkeit zu den *hemA*-Genen oder zu anderen Genen anderer Organismen aufweisen. Der Abschnitt B kodiert für den bisher identifizierten Teil der GluTR aus *Scenedesmus obliquus*.

Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Abb. 18 (S. 80/81) dargestellt. Aus dem Vergleich von *hemA*-Gen-Sequenzen Höherer Pflanzen mit denen aus Prokaryonten ist zu schließen, daß die Länge von 1511 bp wahrscheinlich nicht hinreichend wäre, um vollständig für die Glutamyl-tRNA-Reduktase aus *Scenedesmus obliquus* zu kodieren. Es handelt sich bei dem isolierten Klon also nur um einen Teil der Sequenz des Proteins.

```

GA GCT GTC GCA GCA GCA GCA GCA CAC CTG CTC CAG ACC CAC ACA TGA 47
GTA CTG GGC TGC CAT GGC CCC CTT GGC AGC TTC CAG CAA ACC CAG CTG 95
GCT GGT CAC TGT CAG CAC AGT GTT TGC ACC TTT CTC CCT CTC CAG AAG 143
CTG CAA CAG ACC AGC AGC AGC CTC AGC ACA TCA CCA CCA GAT TAC TCA AAG 191
CGC AGC TGT GGC AGC GGC CTA CTC GCG CAC CGC TGT GCA GCA CAG CAG 239
CAA CAA AAC CAC ACT CAC CAC CAC TGT CAA GTC AGA CTC GTG CTT TGC 287
AGC ACA AAC CAC CTT CTT CTT TTC TTA GTG GGC TGT TTG CAG GAG GCA 335
TGT CCC ACC CAT CTG TGG TGA CTA GGC CTG TGC TTT GGG TGC AGC GTG 383
      M  H  G  S  S  I  M  S  A  H  Q  H
TGC GCG CTG CCC ATG CAT GGC AGC AGC ATG ATG TCA GCA CAT CAG CAC 431
      G  C  N  Q  H  T  L  P  T  A  R  I  L  C  L  W
GGT TGT AAC CAG CAT ACT CTC CCA ACT CCG ACC ATC CTT TGT TTG TGG 479

```

```

P C Q G C L E L P A A A R P Q L
CCT TGC CAA GGG TGC CTT GAG CTT CCT GCA GCG GCG CGG CCT CAC CTA 527

H V V S A H A L T L V A S D M H
CAT CTC CTT TCA CCA CAT GGC CTC ACC CTG GTT GCA TCG GAC ATG CAC 575

Q Y P A S F R R I N L S T L P S
CAA TAC CCT GCA TCA CCT GCG CGC ATC AAC CTT TCA ACA CTT CCT AGC 623

I P A S V F T H R L L L P I Y G
ATC CCC GCA TCT CTC TTC ACT CAG GCG CTC CTC CTC OCT ATA TAC TGC 671

H P H R Y A T E T K N S I I A M
CAC CCC CAC AGG TAT GCC ACC GAG ACC AAG AAC AGC ATC ATC GCC ATG 719

G L T I H N A P V E L R E R L A
GGC CTC ACC ATC CAG AAC GCG CGC GTG GAA CTG CGC GAG AAG CTT CCA 767

V P E A E W F K A I E E L C S Y
GTC CCC GAA GCG GAG TGG CGC CGT GCG ATT GAG GAG CTC TGC AGC TAC 815

P H I E E A A V L S T C N R M E
CCA CAC ATC GAG GAG GCG CCA CTC CTC TCC ACC TGC AAC CGC ATG GAG 864

L Y V V A V S W H R G V R E V E
TTG TAT CTC CTC GCT GTT TCC TGG CAC CGT GCG GTG CGC GAG GTG GAG 911

E W L S K S S G V P L D E L R P
GAG TGG CTC AGC AAG TCT TCC GCG GTG CGG CTT GAC GAG CTC CGC CCT 959

Y L F L L R D R D A T H H L L R
TAC CTC TTC TTC TTC ACC CAC AGG GAT GCG ACC CAC CAC CTC CTC CGT 1007

V S G G L E F L V M G E G Q I L
GTG TCC GCG GGC CTC GAA TTT CTC GTC ATG GCG GAA GGC CAG ATC CTC 1055

A Q V K Q V Y R V G Q N A N G F
CGC CAG GTG AAG CAG GTG TAC AAC CTC CCG CAC AAT GCT AAC GCG TTC 1103

G R Q P N G L F R Q A I T A G K
GCC ACC CAC TTC AAC GCG CTC TTC AAG CAG GCG ATC ACA GCG GCG AAG 1151

R V R S G T S I S T G S V S V S
GGG GTR CGC AGC GAG ACC AGC ATC ACC ACT GCG AGC CTC AGT GTG AGC 1199

S A A V E L A Q L K L P S H N W
AGT GCA GCA GTT GAG CTC GCG CAG CTG AAG CTG CCG AGC CAC AAC TGG 1247

A D A K V C I I G A G K M S T L
GCG GAC GCG AAG GTG TGC ATC ATC GGA GCG GCG AAG ATG AGC ACG CTC 1295

L V R H L L S R G C N Q V
CTG GTC AAC CAC CTC CTC TCA AAG GCG TGC AAC CAG GTG AGA ACA GAG 1343

CAC CCG CTC CCG GGT GGG GTG TGG CTC ATG AGA TGT TTG GCG AGC TGT 1391

TCC TCA TCC TTC CTC CCG TTG TGT GCT GAA AGT GCG TCA CGG ATA GGT 1439

GGC AAT GCG GGT CTC AAC CTC CCG AGT CCA TAT GTG TGT GCA CTT ATA 1487

ACA CAG CAC GCG ACC CCA CCA CAC

```

1511

Abb. 18:

Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des Klonen 20b einer Teilsequenz der Glutamy1-tRNA-Reduktase aus *Scenedesmus obliquus*.

Abbildung 19 (S. 82/83) zeigt einen Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den abgeleiteten HemA 1-Sequenzen anderer Organismen. Bisher wurden von Höheren Pflanzen nur die Aminosäuresequenzen aus *Cucumis sativus* (Tanaka *et al.*, 1996), *Arabidopsis thaliana* (Ilag und Söll, 1994) und *Hordeum vulgare* (Bougri und Grimm, 1996) veröffentlicht. Der Vergleich der Aminosäuresequenz aus *Scenedesmus*, ausgehend vom Methionin des N-Terminus einschließlich des Transitpeptides, mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der GluTR aus *Cucumis sativus* ergab eine Identität von 48,1 %, mit der von *Arabidopsis thaliana* eine solche von 46,5 %. Mit der GluTR von *Hordeum vulgare* besteht eine Identität von 47,8 %. Die Ähnlichkeiten der verglichenen Sequenzen lagen für *Cucumis sativus* bei 70,3 %, für *Arabidopsis thaliana* bei 68 % und für *Hordeum vulgare* bei 65,8 %.

<i>Sc</i>	MEGSSIMSAH	QHGCNQHTIP	TASIDGLWPC	QGGLLELPAAA	40
<i>Cu</i>	MAVSTSFSGA	KLEALLFKSA	SNSSSTRNLS	SSHLPGECKS	40
<i>Ar</i>	MAVSSAFVGC	PKLETLLNHH	NLSPSSSSSS	SVSQTPPLGLN	40
<i>Ho</i>	MAGATS----	-----	-ATAAAGATA	AAKARGPAAA	25
<i>Sc</i>	RPQLHVVSAH	ALTIVASDMH	QYPASPRRIN	LSTLPSIPAS	80
<i>Cu</i>	IRTRRILFQR	TGVSSFTPFK	CELASSDVLV	QNDEIDPFKS	80
<i>Ar</i>	GVRVLPKNR	TRRGLIQKAR	C-----VL	SAGSDSASNA	72
<i>Ho</i>	CPNLVAACCR	RRSCVV---R	C-----DA	GGDAQAASKA	65
<i>Sc</i>	VFTHRLLLPI	YCHPHRYATE	TKNSIIAMGL	TIHNAPVELR	120
<i>Cu</i>	SNLSALEQLK	TSAYDRYTKE	-RSSIVVIGL	SIHTTPVEMR	119
<i>Ar</i>	ASISALEQLK	NSAADRYTKE	-RSSIVVIGL	SIHTAPVEMR	111
<i>Ho</i>	ASITALEQFK	ISA-DRYMKE	-KSSIAVIGL	SVHTAPVEMR	104
<i>Sc</i>	EKLAVPEAEW	PRAIEELCSY	PHIEEAAVLS	TCNRMEIYVV	160
<i>Cu</i>	EKLAIPEAEW	PRAIGELCGL	NHIEEAAVLS	TCNRMEIYVV	159
<i>Ar</i>	EKLAIPEAEW	PRAIAELCGL	NHIEEAAVLS	TCNRMEIYVL	151
<i>Ho</i>	EKLAVAEELW	PRAISELTSI	NHIEEAAVLS	TCNRMEIYVV	144
<i>Sc</i>	AVSWHRGVRE	VEEWLSKSSG	VPLDELRPYL	FLLRDRDATH	200
<i>Cu</i>	ALSQHRGVKE	VTEWMSKTSG	IOVSEICQHR	FLLYNNDATQ	199
<i>Ar</i>	ALSQHRGVKE	VTEWMSNTSG	IPVSEICQHR	FLLYNKDATQ	191
<i>Ho</i>	AEWNRGIRE	VVDWMSKKSC	IPASELREHL	FMLRDSDATR	188



<i>Sc</i>	HLLRVSGGLE	FLVMGEGQIL	AQVKQVVKVG	QNANGFGRQF	240
<i>Cu</i>	HIFEVSACLD	SLVLGEGQIL	AQVKQVVKVG	QGVAGFGRNI	239
<i>Ar</i>	HIFEVSAGLD	SLVLGEGQIL	AQVKQVVKVG	QGVNGFGRNI	231
<i>Ho</i>	HIFEVSAGLD	SLVLGEGQIL	AQVKQVVRNG	QNSCCLGKNI	192
<i>Sc</i>	NGLFKQAITA	GKRVRSSETSI	STGNSVSVSSA	AVELAQLKLP	280
<i>Cu</i>	SGLFKHAIIV	GKRVRTETNI	AAGAVSVSSA	AVELAMMKLP	279
<i>Ar</i>	SGLFKHAIIV	GKRVRTETNI	ASGAVSVSSA	AVELAMMKLP	271
<i>Ho</i>	DRMFKAITA	GKRVRCETNI	SAGAVSVSSA	AVELAMMKLP	232
<i>Sc</i>	SHNWADAKVC	IIGACKMSTL	LVKHLLSKGC	NQVV---RTE	316
<i>Cu</i>	EPGHATARMG	VIGAGKMCKL	VIKHLVAKCC	TKMVVVNRSE	279
<i>Ar</i>	QSSNVSARMC	VIGAGKMGLL	VIKHLMAKGC	TKVVVVNRSE	311
<i>Ho</i>	KSECLSARML	LIGAGKMCKL	VVKHLIAKGC	KKVVVVNRSE	272
<i>Sc</i>	-----	-----	-----	-----	
<i>Cu</i>	ERVTAIREEM	KDVEIIYKPL	TEMLSCTAEA	DVIFTSTASE	319
<i>Ar</i>	ERVSAIREEM	PGIKIYRPL	DEMLANASEA	DVVFTSTASE	351
<i>Ho</i>	ERVDAIREEM	KDIEIVYRPL	TEMYEAAADA	DVVFTSTASE	312
<i>Sc</i>	-----	-----	-----	-----	
<i>Cu</i>	SLLFTKEQVK	DLPPVGHVVG	GLRLFIDISV	PRNVGACINN	359
<i>Ar</i>	TPLFLKEHVE	NLPQASPEVG	GLRHFVDISV	PRNVGSCVGE	391
<i>Ho</i>	SLLFTKEHAE	VLFPISLAMG	GVRLEVDISV	PRNVGACLSE	352
<i>Sc</i>	-----	-----	-----	-----	
<i>Cu</i>	VEDVRVYNVD	DLKEVVAANK	EDRLRKAMEA	QTIITEESTQ	399
<i>Ar</i>	VETARVYNVD	DLKEVVAANK	EDRMKAMEA	QTIITEESTQ	431
<i>Ho</i>	VEHARVYNVD	DLKEVVRANK	EDRVKAMEA	QTIITQELKR	392
<i>Sc</i>	-----	-----	-----	-----	
<i>Cu</i>	FEAWRDSLET	VPTIKKLARY	AERIRTAELE	KCLSKMGDD-	436
<i>Ar</i>	FEAWRDSLET	VPTIKKLARY	AERIRVAELE	KCMSKMGDD-	470
<i>Ho</i>	FEAWRDSLET	VPTIKKLSRY	ADIRASELE	KCLQKIGEDN	432
<i>Sc</i>	-----	-----	-----	-----	
<i>Cu</i>	IPKKTTRAVD	DLRGIVNKL	LHGPMQHLRC	DGSDSRTLSE	478
<i>Ar</i>	INKKTTRAVD	DLRGIVNRK	LHGPMQHLRC	DGSDSRTLSE	510
<i>Ho</i>	LNKKMRRSIE	ELSTGIVNKL	LHGPLQHLRC	DGSDSRTLSE	472
<i>Sc</i>	-----	-----	-----	-----	
<i>Cu</i>	TLENMHALNR	MFSLETEIAV	LEQKIRAKVE	QNQK	512
<i>Ar</i>	TLENMHALNR	MYGLEKDI--	LEEKLKAMAE	COHK	542
<i>Ho</i>	TLENMHALNR	MFSLETSKAV	LEQKIRAKVE	KTQS	506

Abb. 19:

Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der 1511 bp langen Sequenz aus *Scenedesmus obliquus* (*Sc*) mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen des hemA 1 aus : *Cucumis sativus* (*Cu*), *Arabidopsis thaliana* (*Ar*) und *Hordeum vulgare* (*Ho*). Die fett gedruckten Buchstaben zeigen die Positionen der *Scenedesmus*-Sequenz an, die mit den Sequenzen der GluTR aus anderen Pflanzen identisch sind. Der unterstrichene Bereich in diesem Vergleich ist eine mögliche Bindungsstelle für den ADP-Anteil des Cofaktors NADPH der GluTR.

## 4.11 Diskussion zu Kapitel 4.10

Durch das Screenen der cDNA-Bibliothek DD mit der DIG-markierten Sonde B1 konnten die zwei positiv reagierenden Klone 18b und 20b identifiziert werden, die durch Southern-Blot- und Sequenzanalyse weiter charakterisiert wurden. Da der Klon 18b an seinen Enden keine Ähnlichkeiten zu bekannten *hemA*-Sequenzen aus anderen Organismen aufwies wurde der Klon nicht weiter bearbeitet.

Ausgehend vom 5'-Ende wurde durch Primerwalking auf einem Strang ein 1511 bp langes Stück der DNA des Klones 20b sequenziert. Durch Vergleiche auf Nukleinsäure- und auf Aminosäureebene konnte festgestellt werden, daß die Basen 396 bis 1334 für die GluTR aus *Scenedesmus obliquus* kodieren. Der Vergleich auf Aminosäureebene zeigt, daß dies ca. 63 % der Länge der Aminosäuresequenz der GluTR aus *Hordeum vulgare* entspricht (Bougri und Grimm 1996). In Abb. 19 ist ein Vergleich der Teil-Aminosäuressequenz der GluTR aus *Scenedesmus* mit der aus anderen Pflanzen gezeigt. Die Aminosäuren 287 bis 311 sind in dieser Abbildung unterstrichen. Dieser Bereich weist die charakteristische Aminosäuresequenz auf, wie sie für eine ADP-Bindungsstelle typisch ist (Wierenga *et al.*, 1980). ADP ist ein Teil des Reduktionäquivalentes NADPH, welches die GluTR für die Reduktion des tRNA-gebundenen Glutamats zu Glutamat-1-Semialdehyd benötigt. Dieser Bereich ist bei allen GluTR-Sequenzen, die in diesem Vergleich verwendet wurden, hoch konserviert. Auch die Sequenz von *Scenedesmus obliquus* weist in diesem Bereich eine Identität von ca. 60 % zu den anderen Aminosäuresequenzen auf, so daß es sich auch bei der *Scenedesmus*-Sequenz um die Bindungsstelle des Cofaktors NADPH der GluTR handeln könnte. Beim Vergleich der gesamten Aminosäure-Teilsequenz einschließlich des N-terminus und des Transitpeptides der GluTR aus *Scenedesmus* mit den Aminosäure-Sequenzen des Hema 2 aus *Arabidopsis thaliana* (Ilag *et al.*, 1996) und *Cucumis sativus* (Tanaka *et al.*, 1996) wurden weitaus geringere Identitäten gefunden, als mit den Hema 1-Sequenzen der oben genannten Pflanzen. Die Identitäten der *Scenedesmus*-Sequenz mit *Arabidopsis* lagen um 15 % und mit *Cucumis* um ca. 12 % niedriger als beim Vergleich mit der Hema 1 Sequenz der jeweiligen Pflanze. Dies deutet daraufhin, daß es sich bei der gefundenen Sequenz der GluTR aus *Scenedesmus* eher um den Hema 1-Typ des Enzyms aus *Arabidopsis thaliana* und *Cucumis sativus* handelt.

Die Hema 2-Sequenzen wurden in den oben genannten Organismen überwiegend in photosynthetisch inaktiven Pflanzenteilen, wie Wurzeln und Hypokotyl, aber nur in sehr geringem Maße in Cotyledonen gefunden. Die oben genannten Autoren postulieren für *Arabidopsis thaliana* und *Cucumis sativus* aufgrund der zwei *hemA*-Gene zwei unterschiedlich regulierte C<sub>5</sub>-Wege. Der erste C<sub>5</sub>-Weg soll lichtinduziert sein und seine GluTR durch das *hemA* 1-Gen kodiert sein. Dieser Weg soll hauptsächlich für die Chlorophyllbildung genutzt werden. Der zweite C<sub>5</sub>-Weg ist nicht lichtinduziert und wird für die Synthese von Tetrapyrrolen benutzt, die in nicht ergrünenden Teilen der Pflanze benötigt werden. *Scenedesmus* als einzellige Grünalge, besitzt keine differenzierten Pflanzenorgane, was ein zweites *hemA*-Gen und damit eine zweite nicht lichtregulierte Glutamyl-tRNA-Reduktase unnötig macht. Auch die Ergebnisse der Southern-Blot-Experimente mit dem GluTR-Klon 20b aus *Scenedesmus* deuten darauf hin, daß in diesem Organismus nur ein *hemA*-Gen vorhanden sein sollte.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit umfaßt biochemische und molekularbiologische Untersuchungen an der Glutamyl-tRNA-Reduktase aus dem C<sub>5</sub>-Weg zur Chlorophyllbiosynthese. Untersuchungsobjekt war die Mutante C-2A` der einzelligen Grünalge *Scenedesmus obliquus*.

1. Mit Hilfe des für eine erste Anreicherung der anderen Enzyme des C<sub>5</sub>-Weges verwendeten, seriellen Affinitätssäulen-System wurde versucht, die GluTR aus *Scenedesmus obliquus* anzureichern und ihre Aktivität in einem gekoppelten Enzymtest zu messen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte trotz vielfältiger Ansätze keine Aktivität der GluTR gemessen werden. Dies lag vor allem am geringen Vorkommen und der hohen Labilität des Enzyms, woraus sich ergab, daß ca. 500 l Algenkultur in kürzester Zeit hätten aufgearbeitet werden müssen, was unlösbare technische und auch finanzielle Probleme zur Folge gehabt hätte. Bisher konnten nur fünf Glutamyl-tRNA-Reduktasen gereinigt werden

2. Durch Komplementationsexperimente, sowohl mit einer *hemA*-Gen defizienten Punktmutante, wie auch mit einer Deletionsmutante von *E.coli*, wobei rekombinante Plasmid-DNA von *Scenedesmus obliquus* verwendung fand, wurde versucht, das *hemA*-Gen zu isolieren. Bei beiden Mutanten erfolgte keine Komplementation des *hemA*-Gens mit dem entsprechenden Gen aus *Scenedesmus obliquus*. Vielmehr wurde ein Wachstum nicht komplementierter Zellen auf LB-Agar mit den für die Selektion jeweils notwendigen Antibiotika beobachtet. Diese Beobachtung wurde auch von Verkamp *et al.*, 1988 gemacht und zeigt, daß das Fehlen einer funktionsfähigen GluTR nicht letal für den Organismus sein muß. Dies bedeutet aber auch, daß diese Strategie zur Klonierung des *hemA*-Gens nicht geeignet ist.

3. Durch die Anwendung der PCR-Reaktion mit Primern, die aus konservierten Bereichen des *hemA*-Gens überwiegend von prokaryontischen Organismen, aber auch der Sequenzen der Höheren Pflanze *Arabidopsis thaliana* abgeleitet wurden und cDNA aus *Scenedesmus* als DNA-Matrize, konnte ein PCR-Produkt einer Länge von 222 bp amplifiziert werden.

4. Dieses zum *hemA*-Gen aus *Scenedesmus* homologe PCR-Produkt wurde als Sonde zum Screenen von cDNA-Bibliotheken des Organismus eingesetzt. Das Screenen der cDNA-Bibliothek mit dieser Sonde führte zur Isolierung eines cDNA-Klones einer Länge von 1511 bp. In diesem cDNA-Klon kodieren 938 bp für das *hemA*-Gen aus *Scenedesmus obliquus*. Die 938 bp beinhalten den N-Terminus und die Sequenz des Transitpeptides, das ca. 100 Aminosäuren lang ist. Aus dem Längenvergleich mit *hemA*-Genen anderer Pflanzen läßt sich schließen, daß dem Klon noch eine Sequenz von ca. 600 bp fehlt, um für das reife Protein zu kodieren.

5. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Teillängen-cDNA-Klones der GluTR von *Scenedesmus obliquus* umfaßt 316 Aminosäuren. Beim Vergleich auf Aminosäureebene zeigt, daß diese Sequenz ca. 63 % der Länge der Aminosäuresequenz der GluTR aus *Hordeum vulgare* entspricht. Im Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der GluTR aus *Scenedesmus* mit den abgeleiteten Aminosäuren aus *Cucumis sativus*,

*Arabidopsis thaliana* und *Hordeum vulgare* ergaben sich folgende prozentualen Ähnlichkeiten : *Scenedesmus* und *Arabidopsis* 68 %, *Scenedesmus* und *Hordeum vulgare* 65,8 % sowie *Scenedesmus* und *Cucumis sativus* 70,3 %.

6. Die Aminosäuren 287 bis 311 der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *Scenedesmus obliquus* weisen ebenfalls die charakteristische Aminosäuresequenz auf, wie sie für einen ADP-Bindungsstelle typisch ist. Dieser Bereich ist bei allen veröffentlichten GluTR-Sequenzen hochkonserviert. Ein Vergleich dieses Bereiches der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *Scenedesmus* mit der von *Cucumis sativus* ergab eine Identität von 60 %.

7. Für das *Scenedesmus*-Genom konnte durch Southern-Blot-Analyse wahrscheinlich gemacht werden, daß für die Glutamyl-tRNA-Reduktase dieses Organismus nur ein Gen vorliegt. Durch Vergleiche mit der vorhandenen Sequenz aus *Scenedesmus* auf Aminosäureebene mit den Sequenzen aus *Cucumis sativus* und *Arabidopsis thaliana* wurde eine höhere Ähnlichkeit zu den *hemA* 1-Genen als zu den *hemA* 2-Genen der aufgeführten Pflanzen gefunden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß in diesem Sequenzbereich die beiden Gen-Typen einander sehr ähnlich sind.

## 6. Literaturverzeichnis

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990)  
Basic local alignment search tool.  
*J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Atkins J.A.W., Gunning B.E.S., and John P.C.L. (1972)  
Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: Ultrastructure, chemistry and incorporation of  $^{14}\text{C}$ -acetate, studied in synchronous cultures. *Planta* **107**, 1-32.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. (1992)  
Short protocols in molecular biology, 2nd. edition, John Wiley & Sons, New York.
- Avissar Y.J., Moberg P.A. (1995)  
The common origin of the pigments of life - early steps of chlorophyll biosynthesis.  
*Photosynthesis Research* **44**, 221-242.
- Avissar Y.J., Ormerod J.G., Beale S.I. (1989)  
Distribution of  $\delta$ -aminolevulinic acid biosynthetic pathways among phototropic bacterial groups.  
*Arch. Microbiol.* **151**, 513-519.
- Aviv H. and Lederer P. (1972)  
Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymigyllic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1408-1412.
- Beale S.I., Castelfranco P.A. (1973)  
 $^{14}\text{C}$ -Incorporation from exogenous compounds into  $\delta$ -aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52** (corrected in 53), 143-149.
- Beale S.I., Castelfranco P.A. (1973)  
 $^{14}\text{C}$ -Incorporation from exogenous compounds into  $\delta$ -aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52** (corrected in 53), 143-149.
- Beale S.I., Gough S.P., Granic S. (1975)  
Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 291-296.
- Beale, S.I. (1994)  
Biosynthesis of open-chain tetrapyrroles in plants, algae and cyanobacteria.  
Ciba Foundation Symposium 180, 156-171.  
The Biosynthesis of the Tetrapyrrole Pigment
- Bisalputra T., Weier T.E. (1963)  
The cell wall of *Scenedesmus quadricauda*.  
*American J. Bot.* **50**, 1011-1019.
- Bishop N.I. (1971)  
Preparation and properties of mutants: *Scenedesmus*.  
Methods in Enzymol. **23** (part A), 130-143. S.Colowich and N.Kaplan, eds.  
Acad. Press, New York.
- Bishop N.I. and Senger H. (1971)

Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*.  
*Meth. Enzymol.* **23**, 53-66.

Bishop N.I. and Senger H. (1972)  
The development of structure and function in chloroplasts of greening mutants of *Scenedesmus*. II.  
Development of the photosynthetic apparatus.

Bishop N.I. and Wong J. (1971)  
Observations on Photosystem II mutants of *Scenedesmus* pigments and proteinaceous components of the chloroplasts.  
*Biochim. Biophys. Acta* **234**, 433-445.

Bogorad L. (1958)  
The enzymic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. II. Uroporphyrin III.  
*J. Biol. Chem.* **233**, 510-515.

Bougri O.V., Grimm B. (1996b)  
Members of a low-copy number of gene family encoding glutamyl-tRNA reductase are differentially expressed in barley.  
*The Plant J.* **9**, 867-878.

Bougri O.V., Korzun V.N., Grimm B. (1996a)  
Chromosomal assignment of the genes encoding glutamyl-tRNA reductase in barley, wheat and rye and their organization in the barley genome.  
*Hereditas* **124**, 1-6.

Breu V. (1988)  
Die Rolle des 4,5-Dioxovalerats und des Glutamat-1-Semialdehyds bei der Biosynthese von 5-Aminolävulinsäure.  
Dissertation Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg.

Breu V., Dörnemann D. (1988)  
Formation of  $\delta$ -aminolevulinate via glutamate-1-semialdehyd and 4,5-dioxovalerate with participation of an RNA component in *Scenedesmus obliquus*, mutant C-2A'.  
*Biochim. Biophys. Acta* **967**, 135-140.

Brinkmann G. and Senger H. (1978)  
Light dependent formation of thylakoid membranes during the development of the photosynthetic apparatus in pigment mutant C-2A' of *Scenedesmus obliquus*. In: Chloroplast, (G. Akoyunoglou ed.) Elsevier North Holland Biochemical Press, Dordrecht, pp. 201-206.

Brinkmann G. und Senger H. (1979)  
Lichtabhängige Bildung der Thylakoidmembran während der Entwicklung des Photosyntheseapparates in der Pigmentmutante C-2A' von *Scenedesmus obliquus*.  
*Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **92**, 629-636.

Bryant P., Kannangara C.G. (1987)  
Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinate in greening barley leaves.  
VIII. Purification and characterization of the glutamate-tRNA-ligase.  
*Carlsberg Res. Commun.* **52**, 99-109.

Chen .M.-W., Jahn D., O'Neill G.P., Söll D. (1990)  
Purification of the glutamyl-tRNA reductase from *Chlamydomonas reinhardtii* involved in  $\delta$ -aminolevulinic acid formation during chlorophyll biosynthesis.

*J. Biol. Chem.* **265** (7), 4058-4061.

Clark J.M. (1988)

Novel, non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eukaryotic DNA polymerases.

*Nucl. Acid Res.* **16**, 9677.

Dörnemann D. (1992)

New aspects of the intermediates, catalytic components and the regulation of the C<sub>5</sub>-pathway to chlorophyll. In: Regulation of chloroplast biogenesis. Argyroudi Akoyunoglou (ed.), Plenum Press, New York, 175-181.

Dörnemann D., Kotzabasis K., Richter P., Breu V., Senger H. (1989)

The regulation of chlorophyll biosynthesis by the action of protochlorophyllide on <sup>glu</sup>t-RNA-Ligase.

*Botanica Acta* **102**, 112-115.

Dower W.S., Miller J.F. and Ragdale C.W. (1988)

High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation.

*Nucl. Acids Res.* **16**, 6127-6145.

Drechsler-Thielmann B., Dörnemann D., Senger H. (1993)

Synthesis of protoheme via both, the C<sub>5</sub>- and the Shemin-pathway, in the pigment mutant C-2A' of *Scenedesmus obliquus*.

*Z. Naturforsch.* **48c**, 584-589.

Dzelskalns V., Foley T. and Beale S.I. (1982)

δ -Aminolevulinic acid synthase of *Euglena gracilis*: physical and kinetic properties.

*Arch. Biochem. Biophys.* **216**, 196-203.

Easterday R.C., Easterday J.M. (1974)

Affinity chromatography of kinases and dehydrogenases on Sephadex and Sepharose dye derivatives.

*Adv. Exp. Med.Biol.* **42**, 123-132.

Eisfeld K. (1994)

Isolierung und Charakterisierung Rot- und Blaulicht-regulierter cDNAs aus der einzelligen Grünalge *Scenedesmus obliquus*.

Diplomarbeit Biologie, Universität Marburg.

Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., Moras D. (1990)

Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs.

*Nature* **347**, 203-206.

Evans J.N.S., Burton G., Fagerness P.E., Mackenzie N.E., Scott A.I. (1986)

Biosynthesis of porphyrins and corrins. 2. Isolation, purification and NMR-investigations of the porphobilinogen-deaminase-covalent complex.

*Biochemistry* **25**, 905-912.

Friedmann H.C., Thauer R.K. (1986)

Ribonuclease sensitive δ -aminolevulinic acid formation from glutamate in cell extracts of *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

*FEBS Letters* **207**, 84-88.

Fujino E., Fujino T., Karita S., Sakka K. and Ohmiya K. (1995)

Cloning and sequencing of some genes responsible for porphyrin biosynthesis from the bacterium *Clostridium*

*josui.*

*J. Bacteriol.* **177**, 5169-5175.

Gaffron H. (1939)

Reduction of carbon monoxide with molecular hydrogen in green algae.

*Nature* **143**, 204-205.

Gibson K.D., Lawer W.G., Neuberger (1958)

Initial stages in the biosynthesis of porphyrins.

2. The formate of  $\delta$ -aminolevulinic acid from glycine and succinyl-coenzym A by particles from chicken erythrocytes.

*Biochem. J.* **70**, 71-81.

Gough S.P., Kannangara C.G., Bock K. (1989)

A new method for the synthesis of glutamate-1-semialdehyde. Characterization of its structure in solution by NMR.

*Carlsberg Res. Commun.* **54**, 99-108.

Grimm B. (1990)

Primary structure of a key enzyme in plant tetrapyrrole synthesis: Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase.

*Proc. Natl. Acad. USA*, **87**, 4169-4173.

Grimm B., Smith A.J., Kannangara C.G., Smith M. (1991)

Gabaculine-resistant glutamate-1-semialdehyde aminotransferase of *Synechococcus*. Deletion of a tripeptide close to the NH<sub>2</sub>-terminus and internal amino acid substitution.

*J. Biol. Chem.* **266**, 12495-12501.

Hansson M., Rutberg L., Schröder I. and Hederstedt L. (1991)

The *Bacillus subtilis* hemAXCDBL Gene Cluster, which Encodes Enzymes of the Biosynthetic Pathway from Glutamate to Uroporphyrinogen III.

*J. Bacteriol.* **173**, 2590-2599.

Hara-Yokoyama M., Yokoyama S., Miyazawa T. (1986)

Conformation Change of tRNA<sup>Glu</sup> in the Complex with Glutamyl-tRNA Synthetase Is Required for the Specific Binding of L-Glutamate.

*Biochemistry* **25**, 7031-7036.

Hart G.J., Leeper F.J., Battersby A.R. (1984)

Modification of hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) by pyridoxal phosphate: Demonstration of an essential lysine residue.

*Biochem. J.* **222**, 93-102.

Harvey R.J. and Darkison M.G. (1991)

Random-primed cDNA synthesis facilitates the isolation of multiple 5'-cDNA ends by RACE.

*Nucl. Acids . Res.* **19**, 4002.

Hendry G.A.F., Houghton J.D., Brown S.B. (1987)

The degradation of chlorophyll - a biological enigma.

*New Phytol.* **107**, 255-302.

Hong K.W., Ibbá M., Weyganddurasevic I., Rogers M.J., Thimann H.U., Söll D. (1996)

Transfer RNA-Dependent Cognate Amino Acid Recognition by an Aminoacyl-Transfer RNA Synthetase. *EMBO* **15**, 1983-1991.



- Hooper J.K., Kahn A., Ash D.E., Gough S.P., Kannangara C.G. (1988)  
Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinate in greening barley leaves. XI. Structure of the substrate, mode of gabaculine inhibition and catalytic mechanism of glutamate-1-semialdehyde aminotransferase.  
*Carlsberg Res. Commun.* **53**, 11-25.
- Houghton J.D., Brown S.B., Gough S.P., Kannangara C.G. (1989)  
Biosynthesis of 5-aminolevulinate in *Cyanidium caldarium*: Characterization of tRNA<sup>Glu</sup>, Ligase, Dehydrogenase and Glutamate-1-semialdehyde-aminotransferase.  
*Carlsberg Res. Commun.* **54**, 131-143.
- Hung T., Mak K. and Fong K. (1990)  
A specific enhancer for polymerase chain reaction.  
*Nucl. Acids . Res.* **18**, 4953.
- Hungerer Chr., Troup B., Römling U., and Jahn D. (1995)  
Regulation of the *hemA* Gene during 5-Aminolevulinic Acid Formation in *Pseudomonas aeruginosa*.  
*J. Bacteriol.* **177**, 1435-1443.
- Ilag L. L., Jahn D., Eggertson G. and Söll D. (1991)  
The *Escherichia coli hemL* gene encodes glutamate-1-semialdehyde aminotransferase.  
*J. Bacteriol.* **173**, 3408-3413.
- Ilag L.L., Kumar A.M., and Söll D. (1994)  
Light Regulation of Chlorophyll Biosynthesis at the Level of 5-aminolävulinate formation in *Arabidopsis*.  
*The Plant Cell* **6**, 265-275.
- Jahn D. (1992)  
Complex formation between glutamyl-tRNA synthetase and glutamyl-tRNA reductase during the tRNA-dependent synthesis of 5-aminolevulinic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*.  
*FEBS* **314**, 77-80.
- Jahn D., Kim Y.-C., Ishino Y., Chen M.-W., Söll D. (1990)  
Purification and functional characterization of the Glu-tRNA<sup>Gln</sup> Aminotransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 8059-8064.
- Jahn D., Michaelsen U., Söll D. (1991)  
Two glutamyl-tRNA reductase activities in *Escherichia coli*.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 2542-2548.
- Jahn D., O'Neill G.P., Verkamp E., Söll D. (1992)  
Glutamate tRNA: Involvement in protein synthesis and aminolevulinate formation in *Chlamydomonas reinhardtii*.  
*Plant Physiol. Biochem.* **30(3)**, 245-253.
- Jahn D., Verkamp E., Söll D. (1992)  
Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis.  
*TIBS* **17**, 215-218.
- Kannangara C.G., Andersen R.V., Pontoppidan B., Willows R., Wettstein v.D. (1994)  
Enzymic and mechanistic studies on the conversion of glutamate to 5-aminolevulinate.  
Ciba Foundation Symposium 180, 3-25.  
The Biosynthesis of the Tetrapyrrole Pigment

- Kannangara C.G., Gough S.P., Oliver R.P., Rasmussen S.K. (1984)  
Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinate in greening barley leaves.  
VI. Activation of glutamate by ligation to RNA.  
*Carlsberg Res. Commun.* **49**, 417-437.
- Kessler E., Arthur W., Brugger J.E. (1957)  
The influence of manganese and phosphate on delayed light emission, fluorescence, photoreduction and photosynthesis in algae.  
*Arch. Biochem. Biophys.* **71**, 326-335.
- Kikuchi G., Kumar A., Talamage D., Shemin D. (1958)  
The enzymatic synthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid.  
*J. Biol. Chem.* **233**, 1214-1219.
- Klein O., Dörnemann D., Senger H. (1980)  
Two biosynthetic pathways to 5-aminolevulinic acid in algae.  
*Int. J. Biochem.* **12**, 725-728.
- Klein O., Senger H. (1978)  
Two biosynthetic pathways to  $\delta$ -aminolevulinic acid in a pigment mutant of the green alga *Scenedesmus obliquus*.  
*Plant Physiol.* **62**, 10-13.
- Kloppstech K., Schweiger H.G. (1976).  
*In vitro* translation of poly(A)RNA from *Acetabularia*.  
*Cytobiology* **13**, 394-400.
- Kratz W.A., Myers J. (1955)  
Nutrition and growth of several blue-green algae.  
*Amer. J. Bot.* **42**, 282-287.
- Kumar A.M., Csankovszki G., Söll D. (1996)  
A second and differentially expressed glutamyl-tRNA reductase gene from *Arabidopsis thaliana*.  
*Plant Mol. Biol.* **30**, 419-426.
- Lawlor D.W. (1990)  
Photosynthese  
Georg Thieme Verlag
- Liedgens W., Grützmann R., Schneider H.A.W (1983)  
Molecular properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Spinacia oleracea*.  
*Eur. J. Biochem.* **135**, 75-79.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., und Randall R.J. (1951)  
Protein measurement with folin reagent.  
*J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Majumbar D., Avissar Y.j., Wyche J.H. and Beale S.I. (1991)  
Structure and expression of the *Chlorobium vibrioforme* hemA gene.  
*Arch. Microbiol.* **156**, 281-289.
- Manuelidis L. (1976)  
A simplified method for the preparation of mouse satellite DNA.  
*Anal. Biochem.* **78**, 561-568.

- Masuda T., Komine Y., Inokuchi H., Kannangara C.G., Tsujii H. (1992)  
Sequence and expression of tRNA<sup>Glu</sup> gene of cucumber chloroplast genome.  
*Plant Physiol. Biochem.* **30**, 235-243.
- Mayer S.M., Beale S.I., and Weinstein J.D. (1987)  
Enzymatic conversion of glutamate to  $\delta$ -aminolevulinic acid in soluble extracts of *Euglena gracilis*.  
*J. Biol. Chem.* **262**, 12541-12549.
- Moras D. (1992)  
Structural and functional relationships between aminoacyl-tRNA synthetases.  
*TIBS* **17**, 159-164.
- Murray M.G., and Thompson W.F. (1980)  
Rapid isolation of high molecular weight plant DNA.  
*Nucl. Acids Res.* **8**, 4321-4325.
- Nureki O., Suzuki K., Hara-Yokoyama M., Kohno T., Matsuzawa H., Ohta T., Shimizu T., Morikawa K., Miyazawa T., Yokoyama S. (1992)  
Glutamyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* HB.  
*Eur. J. Biochem.* **204**, 465-472.
- O'Neill G.P., Peterson D.M., Schön A., Chen M.W. and Söll D. (1988)  
Formation of the chlorophyll precursor  $\delta$ -aminolevulinic acid in cyanobacteria requires aminoacylation of a tRNA<sup>Glu</sup> species.  
*J. Bacteriol.* **170**, 3810-3816.
- O'Neill G.P., Jahn D., Söll D. (1991)  
Transfer RNA involvement in chlorophyll biosynthesis.  
*Subcellular Biochem.* **17**, 235-264.
- Oltmanns F. (1905)  
Morphologie und Biologie der Algen.  
Gustav Fischer Verlag, Jena, 155-164.
- Pelham H. (1985)  
Cleaning up plasmid minipreps with lithium chloride.  
*Trends Genet.* **1**, 6.
- Petricek M., Rutberg L., Schröder I., and Hederstedt L. (1990)  
Cloning and Characterization of the *hemA* region of the *Bacillus subtilis* Chromosome.  
*J. Bacteriol.* **172**, 2250-2258.
- Plant Cell Physiol  
. **13**, 937-953.
- Pontoppidan B., Kannangara C.G. (1994)  
Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNA<sup>Glu</sup> reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis.  
*Eur. J. Biochem.* **225**, 529-537.
- Ratinaud M.H., Thomes J.C., Julien R. (1983)  
Glutamyl-tRNA synthetases from wheat. Isolation and characterization of three dimeric enzymes.  
*Eur. J. Biochem.* **135**, 471-477.

- Richards W.R. (1993)  
Biosynthesis of the Chlorophyll Chromophore of Pigmented Thylakoid Proteins.  
Pigment Protein Complexes in Plastids: Synthesis and Assembly.  
C. Sundquist, M. Rydberg eds.
- Richter G. (1996)  
Biochemie der Pflanzen  
Georg Thieme Verlag
- Richter P. (1994)  
Molekularbiologische Untersuchungen an der NADPH: Protochlorophyllid Oxidoreduktase von *Scenedesmus obliquus*.  
Dissertation Chemie, Universität Marburg.
- Rieble S. and Beale S. I. (1991)  
Purification of Glutamyl-tRNA Reductase from *Synechocystis* sp. PCC 6803\*.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 9740-9745.
- Rould M.A., Perona J.J., Söll D., Steitz T.A. (1989)  
Structure of *E. coli* Glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA<sup>Gln</sup> and ATP at 2.8 Å Resolution.  
*Science* **246**, 1135-1142
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989).  
Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor. Laboratory Press. New York.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977)  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5436-5467.
- Schmidt E., Schimmel P. (1995)  
Residues in a Class I tRNA Synthetase which Determine Selectivity of Amino Acid Recognition in the Context of tRNA.  
*Biochemistry* **34**, 11204-11210.
- Schön A., Kannangara C.G., Gough S., Söll D. (1988)  
Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA.  
*Nature* **331**, 187-190.
- Schön A., Krupp G., Gough S., Berry-Lowe S., Kannangara G., Söll D. (1986).  
The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA.  
*Nature* **322**, 281-284.
- Senger H. (1970)  
Charakterisierung einer Synchronkultur von *Scenedesmus obliquus*, ihrer potentiellen Photosyntheseleistung und des Photosynthesequotienten während des Entwicklungszyklus.  
*Planta* **90**, 243-266.
- Senger H. and Straßberger G. (1978)  
Development of the photosystems in greening algae, in: Chloroplast development (G. Akoyunoglou et al., eds.) Elsevier North-Holland Biochemical Press, Dordrecht 367-378.
- Senger H., Mell V. (1977)  
Preparation of photosynthetically active particles from synchronized cultures of unicellular algae.  
In: Methods in Cell Biology **XV**, 201-219.

(D.M. Prescott, ed.), Acad. Press, New York and London

Senger H., Wagner C., Hermsmeier D., Hohl N., Urbig T., und Bishop N.I. (1993)  
The influence of light intensity and wavelength on the contents of  $\alpha$  - and  $\beta$  -carotene and their xanthophylls in green algae.

*J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **18**, 273-279.

Shemin D., Rittenberg D. (1945)

The utilization of glycine for the synthesis of a porphyrin.

*J. Biol. Chem.* **159**, 567-568.

Shemin D., Russel C.S. (1953)

$\delta$  -aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines.

*J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4837-4874.

Smith A.G., Griffith W.T. (1993)

Enzyme of chlorophyll and heme biosynthesis.

In *Methods in Plant biochemistry* (P.J. Lea ed.) Vol. 9, pp 299-343, Acad. Press, London.

Smith M.A., Kannangara C.G., Grimm B. (1992)

Glutamate-1-Semialdehyde Aminotransferase: Anomalous Enantiomeric Reaction and Enzyme Mechanism.

*Biochemistry* **31**, 11249-11254.

Smith M.A., Kannangara C.G., Grimm B., v. Wettstein D. (1991)

Characterization of glutamate-1-semialdehyde aminotransferase of *Synechococcus*: Steady state kinetic analysis.

*Eur. J. Biochem.* **202**, 749-757.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Malia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. and Klenk D.C. (1985)

Measurement of protein using bicichioninic acid .

*Anal. Biochem.* **150**, 76-85.

Southern E. (1975)

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoreses. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.

Stange-Thomann N., Thomann H.-U., Lloyd A.J., Lyman H., Söll D. (1994)

A point mutation in *Euglena gracilis* chloroplast tRNA<sup>Glu</sup> uncouples protein and chlorophyll biosynthesis.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7947-7951.

Stolz M. (1995)

Die Reinigung und Charakterisierung von Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase,

5-Aminolävulinsäure-Dehydratase und Phosphoserin-Aminotransferase und die Klonierung des *gsa*-Gens von Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase aus *Scenedesmus obliquus*.

Dissertation, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.

Stolz M., Dörnemann D. (1996)

Purification, Metal Cofactor, N-Terminal Sequence and Subunit Composition of a

5-Aminolevulinic Acid Dehydratase from the Unicellular Green-Alga *Scenedesmus obliquus*.

*Eur. J. Biochem.* **236**, 600-608.

Strauch M.A., Zalkin H., and Aronson A. (1988)

Characterization of the glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> to Glutaminy-tRNA<sup>Gln</sup> Amidotransferase Reaction of *Bacillus*

*subtilis*.

*J. Bacteriol.* **170**, 916-920.

Sylvers L.A., Rogers K.C., Shimizu M., Ohtsuka E., and Söll D. (1993)

A 2-thiouridine derivative in tRNA<sup>Glu</sup> is a positive determinant for aminoacylation by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase.

*Biochem.* **32**, 3836-3841.

Tanaka R., Yoshida K., Nakayashiki T., Masuda T., Tsuji H., Inokuchi H., Tanaka A. (1996)

Differential Expression of Two *hemA* mRNAs Encoding Glutamyl-tRNA Reductase Proteins in Greening Cucumber Seedlings.

*Plant Physiol.* **110**, 1223-1230.

Todd C., Diner B., Bowyer J. (1990)

Isolation and sequence analysis of the PSBA gene from *Scenedesmus obliquus*.

In: Current Research in Photosynthesis, Vol. III, (M. Baltscheffsky, ed.),

Kluwer Academic Publishers, 561-564.

Uherkovich G. (1966)

Die *Scenedesmus*-Arten Ungarns. Ungarische Akademie der Wissenschaften, Budapest.

Venhaus S. (1997)

Untersuchungen an der Glutamyl-tRNA-Synthetase und der tRNA<sup>Glu</sup> im C<sub>5</sub>-Weg der Mutante C-2A der einzelligen Grünalge *Scenedesmus obliquus*.

Dissertation, Fachbereich Chemie; Philipps-Universität Marburg.

Verkamp E. and Chelm B.K. (1989)

Isolation, nucleotide sequence and preliminary characterization of the *Escherichia coli* K-12 *hemA* gene.

*J. Bacteriol.* **171**, 4728-4735.

Verkamp E., Jahn M., Jahn D., Kumar A.M., and Söll D. (1992)

Glutamyl-tRNA Reductase from *Escherichia coli* and *Synechocystis* 6803\*.

*J. Biol. Chem.* **12**, 8275-8260.

Vothknecht U.C. (1993)

Untersuchungen zur Glutamyl-tRNA Synthetase und zur weiteren Umsetzung von Glutamat zu

Glutamat-1-Semialdehyd in der Mutante C-2A' der einzelligen Grünalge *Scenedesmus obliquus*. Dissertation Biologie, Universität Marburg.

Vothknecht U.C., Kannangara C.G., and v. Wettstein D. (1996)

Expression of catalytically active barley glutamyl tRNA<sup>Glu</sup> reductase in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione S-transferase.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9287-9291.

Vothknecht U.C., Senger H., and Dörnemann D., (1994)

Purification and partial characterization of a glutamyl-tRNA synthetase from the unicellular green algae *Scenedesmus obliquus*, mutant C-2A .

*Planta* **192**, 256-260.

Wang W., Gough S.P., Kannangara C.G. (1981)

Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinate in greening barley leaves

IV. Isolation of three soluble enzymes required for the conversion of glutamate to  $\delta$ -aminolevulinate.

*Carlsberg Res. Commun.* **46**, 243-257.

Weinstein J.D., Beale S.I. (1983)

Separate roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*.  
*J. Biol. Chem.* **258**, 679-687.

Wellburn F.A.M., Wellburn A.R. and Senger H. (1980)

Changes in ultrastructure and photosynthetic capacity within *Scenedesmus obliquus* mutants C-2A<sup>-</sup>, C-6D, and C-6E on transfer from dark grown to illuminated conditions.  
*Protoplasma* **103**, 35-54.

Wierenga R.K., Terpstra P. and Wim G.J.H. (1986)

Prediction of the Occurrence of the ADP-binding  $\beta$   $\alpha$   $\beta$  -fold in Proteins, Using an Amino Acid Sequence Fingerprint.  
*J. Mol. Biol.* **187**, 101-017.

Willows R.D., Kannangara C.G., Pontoppidan B. (1995)

Nucleotides of tRNA(Glu) involved in recognition by barley chloroplast glutamyl-tRNA synthetase and glutamyl-tRNA reductase.  
*Biochim. Biophys. Acta* **1263**, 228-234.

Zinn T.H. (1994)

Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen an der Hydrogenase der einzelligen eukaryotischen Grünalge *Scenedesmus obliquus*.  
Dissertation, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg.

## Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation mit dem Titel,

"Biochemische Untersuchungen zur Glutamyl-tRNA-Reduktase im C<sub>5</sub>-Weg und die Klonierung einer Teilsequenz des korrespondierenden *hemA*-Gens der einzelligen Grünalge *Scenedesmus obliquus*"

selbständig, ohne unerlaubte, Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Steffen Borzner, Marburg den 01.09.1997